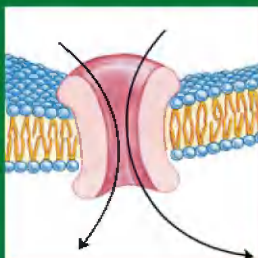


ЛУЧШИЙ ЗАРУБЕЖНЫЙ УЧЕБНИК



**Д. НЕЛЬСОН
М. КОКС**

ОСНОВЫ БИОХИМИИ ЛЕНИНДЖЕРА

1

**ОСНОВЫ БИОХИМИИ
СТРОЕНИЕ И КАТАЛИЗ**

ОСНОВЫ БИОХИМИИ ЛЕНИНДЖЕРА

LENINGER

PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY

Fifth Edition

David L. Nelson
Professor of Biochemistry
University of Wisconsin-Madison

Michael M. Cox
Professor of Biochemistry
University of Wisconsin-Madison



W. H. FREEMAN AND COMPANY
New York



ЛУЧШИЙ ЗАРУБЕЖНЫЙ УЧЕБНИК

Д. Нельсон
М. Кокс

ОСНОВЫ БИОХИМИИ ЛЕНИНДЖЕРА

В трех томах

1

ОСНОВЫ БИОХИМИИ СТРОЕНИЕ И КАТАЛИЗ

Издание 4-е, исправленное, электронное

Перевод с английского
канд. хим. наук Т. П. Мосоловой
канд. хим. наук Е. М. Молочкиной
канд. биол. наук В. В. Белова

под редакцией
академика РАН А. А. Богданова
и член-корр. РАН С. Н. Кочеткова



Москва
Лаборатория знаний
2020

УДК 578.1
ББК 28.072я73
Н49

Серия основана в 2006 г.

Нельсон Д.

Н49 Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. Т. 1 : Основы биохимии, строение и катализ / Д. Нельсон, М. Кокс ; пер. с англ. — 4-е изд., электрон. — М. : Лаборатория знаний, 2020. — 749 с. — (Лучший зарубежный учебник). — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10". — Загл. с титул. экрана. — Текст : электронный.

ISBN 978-5-00101-864-3 (Т. 1)

ISBN 978-5-00101-863-6

В учебном издании, написанном американскими учеными, которые получили признание как талантливые преподаватели университетского уровня, рассмотрены современные концепции биохимии в соответствии с изменившейся идеологией этой науки.

В томе 1 рассмотрены основы биохимии, связь строения биомолекул с их реакционной и каталитической активностью, строение и функции биомембран, механизмы биосигнализации.

Для студентов биологических, химических и медицинских вузов, а также научных работников.

УДК 578.1
ББК 28.072я73

Деривативное издание на основе печатного аналога: Основы биохимии Ленинджера : в 3 т. Т. 1 : Основы биохимии, строение и катализ / Д. Нельсон, М. Кокс ; пер. с англ. — 4-е изд. — М. : Лаборатория знаний, 2020. — 704 с. : ил. — (Лучший зарубежный учебник). — ISBN 978-5-00101-246-7 (Т. 1); ISBN 978-5-00101-245-0.

В соответствии со ст. 1299 и 1301 ГК РФ при устранении ограничений, установленных техническими средствами защиты авторских прав, правообладатель вправе требовать от нарушителя возмещения убытков или выплаты компенсации

ISBN 978-5-00101-864-3 (Т. 1)
ISBN 978-5-00101-863-6

First published in the United States
by W. H. FREEMAN AND COMPANY,
New York
Copyright © 2008 by W. H. Freeman and Company
All rights reserved.
© Перевод на русский язык,
Лаборатория знаний, 2015

Перед Вами, читатель, настольная книга всех биохимиков и молекулярных биологов.

Почти 40 лет назад был опубликован блестящий учебник Альберта Ленинджера «Биохимия» (*Biochemistry: The Molecular Basis of Cells Structure and Function by Albert L. Lehninger. New York: Worth Publishers, 1972*). На русском языке эта книга издавалась дважды (Ленинджер А. Биохимия, М.: Мир, 1974, 1976). Следуя за развитием науки, автор переработал учебник, который появился под названием «Основы биохимии» (*Lehninger A. L. Principles of Biochemistry. Worth Publishers, New York, 1982*). Книга выдержала несколько переизданий на английском языке, а также переводов на основные «научные» языки мира. У нас в стране этот учебник вышел в трех томах (Ленинджер А. Основы биохимии. В 3 т. — М.: Мир, 1985). Можно без преувеличения сказать, что на этой книге выросли по крайней мере два поколения исследователей.

За прошедшие годы были сделаны выдающиеся открытия в науках о жизни, кардинальные изменения претерпели экспериментальные методы, изменилась и сама идеология биохимии. Все это требовало существенного пересмотра и обновления учебника.

После кончины А. Ленинджера труд по подготовке новых изданий взяли на себя Дэвид Нельсон и Майкл Кокс, которые по существу написали новую книгу, сохранив общие принципы построения учебника Ленинджера, отразив преемственность в названии (*Lehninger Principles of Biochemistry*). С новым авторским коллективом книга вышла уже дважды (4-е и 5-е изд. — 2003, 2005 гг.).

Теперь этот учебник предлагается русскоязычному читателю. Как и ранее, в русском переводе «Основы биохимии» выходят в трех томах, что, безусловно, будет удобно читателю, в первую очередь студенту. Деление на тома соответствует тематическим частям, выделенным авторами (Часть I. Строение и катализ. Часть II. Биоэнергетика и метаболизм. Часть III. Пути передачи информации).

В первый том «Основы биохимии. Строение и катализ» вошли предисловия, статьи об авторах и вступительная статья, глава 1 «Основы биохимии», где даны основные понятия биохимии, охарактеризованы компоненты клетки, а также часть I «Строение и катализ» (главы 2–12), где

рассмотрены важнейшие биомолекулы и некоторые ключевые процессы, такие как биологический транспорт и передача сигнала.

Во втором томе «Биоэнергетика и метаболизм» (главы 13–23) рассмотрены главные принципы биоэнергетики, пути распада и синтеза клеточных компонентов, а также гормональная регуляция и интеграция метаболизма у млекопитающих.


Третий том «Пути передачи информации» (главы 24–28) посвящен принципам передачи генетической информации и регуляции экспрессии генов. В конце третьего тома находятся глоссарий, используемые сокращения и обозначения, ответы к задачам, предметный указатель ко всему комплекту из трех томов.

При изучении биохимии читатель сможет легко убедиться в достоинствах этого учебника, который получил особое признание у специалистов за систематичность изложения материала. Здесь приведены определения всех основных терминов и краткое описание наиболее важных экспериментальных методов. Особо следует отметить великолепные иллюстрации, внимательное изучение которых дает возможность полнее понять суть описываемых процессов.*

Не сомневаемся, что эта книга будет весьма востребованной. Новое издание на русском языке этого всемирно известного учебника окажет неоценимую помощь студентам и аспирантам, изучающим биохимию, а также преподавателям. Все научные сотрудники смогут с пользой и удовольствием читать и перечитывать интересный материал, каждый раз открывая что-то новое в любимой науке.

Перевод книги выполнен Т. П. Мосоловой (предисловие, главы 1–7, 14–16, а также фрагменты текста, появившиеся в 5-м издании), Н. Н. Багровой (главы 8, 18, 20, 22), В. В. Беловым (главы 9, 13, 17), Е. М. Молочкиной (главы 10–12, 21), Н. Л. Арюткиной (глава 19), О. М. Алексеевой (глава 23), О. В. Ефременковой (главы 24–28).

А. А. Богданов, академик РАН
С. Н. Кочетков, член-корр. РАН

* В тексте даны ссылки на электронные ресурсы . См. сайт <http://bcs.whfreeman.com/lehninger5e/>.

ТОМ 1

1 Основы биохимии

Часть I СТРОЕНИЕ И КАТАЛИЗ

2 Вода

3 Аминокислоты, пептиды и белки

4 Трехмерная структура белков

5 Функции белков

6 Ферменты

7 Углеводы и гликобиология

8 Нуклеотиды и нуклеиновые кислоты

9 Технологии на основе информации из ДНК

10 Липиды

11 Биологические мембраны и транспорт

12 Биосигнализация

ТОМ 2

Часть II

БИОЭНЕРГЕТИКА И МЕТАБОЛИЗМ

13 Принципы биоэнергетики

14 Гликолиз, глюконеогенез и пентозофосфатный путь

15 Принципы регуляции метаболизма на примере метаболизма глюкозы и гликогена

16 Цикл лимонной кислоты

17 Катаболизм жирных кислот

18 Окисление жирных кислот и образование мочевины

19 Окислительное фосфорилирование и фотофосфорилирование

20 Биосинтез углеводов у растений и бактерий

21 Биосинтез липидов

22 Биосинтез аминокислот, нуклеотидов и связанных с их метаболизмом молекул

23 Интеграция и гормональная регуляция метаболизма у млекопитающих

ТОМ 3

Часть III

ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ИНФОРМАЦИИ

24 Гены и хромосомы

25 Метаболизм ДНК

26 Метаболизм РНК

27 Метаболизм белка

28 Регуляция генной экспрессии

Приложение 1. Сокращения и обозначения, используемые в биохимии

Приложение 2. Ответы к задачам

Глоссарий

Источники иллюстраций

Предметный указатель

Дэвид Л. Нельсон родился в Фэрмонте, штат Миннесота, США. Получил степень бакалавра по химии и биологии в колледже Св. Олафа в 1964 г. Выполнил диссертационную работу по биохимии в медицинской школе Стэнфорда под руководством Артура Корнберга. Получив стипендию Гарвардской медицинской школы, работал вместе с Юджином П. Кеннеди, который был одним из первых аспирантов Ленинджера. В 1971 г. Нельсон работает в университете Висконсин-Мэдисон, с 1982 г. — в должности профессора биохимии; в настоящее время — директор Центра биологического образования.

Научные интересы Нельсона связаны с изучением передачи сигналов, регулирующих движение ресничек и эндоцитоз у простейших рода *Paramecium* (в основном его работы посвящены определению роли ферментов, в частности протеинкиназ, в передаче сигнала). В научной группе Нельсона используют современные методы исследования: различные методы очистки белка, иммунологические методы анализа, электронная микроскопия, а также генетические, молекулярно-биологические и электрофизиологические методы.

Нельсон известен как выдающийся лектор и преподаватель. Более 40 лет он курирует лекционные курсы по биохимии для студентов, специализирующихся в различных областях биологической науки. Он читает также лекции по курсу биохимии студентам, изучающим медсестринское дело, лекции для аспирантов по структуре и функциям мембран и по молекулярной нейрофизиологии. Инициатор организации многих стипендий с целью поддержки активно работающих студентов и аспирантов. За свою выдающуюся преподавательскую деятельность Нельсон получал награды, в том числе премию Дрейфуса для педагогов-ученых. Имеет звание почетного профессора Университета Висконсина. В 1991–1992 гг. Нельсон был приглашенным профессором в Колледже Спелмана. Вторая страсть ученого — история науки, вот почему он читает студентам курс истории биохимии и собирает собственную коллекцию старинных научных инструментов.



Дэвид Л. Нельсон и Майкл М. Кокс

Майкл М. Кокс родился в Уилмингтоне, штат Делавэр, США. С самого начала изучения биохимии книга Ленинджера оказала на М. Кокса столь сильное влияние, что переориентировала его научные интересы от биологии к биохимии. По окончании университета шт. Делавэр в 1974 г. Кокс выполнил диссертационную работу в университете Брандейса под руководством Уильяма П. Дженкса; с 1979 г. работал в Стэнфордском университете под руководством Роберта Лемана. С 1983 г. М. Кокс работает в университете Висконсин-Мэдисон, а с 1992 г. — в должности профессора биохимии. Диссертация Кокса посвящена применению модели общего кислотно-основного катализа для изучения ферментативных реакций. В Стэнфордском университете он занимался изучением ферментов, участвующих в рекомбинации генов, уделив основное внимание изучению белка RecA и установлению механизма переноса нити ДНК; разработанные Коксом методы выделения и анализа белка RecA используются до сих пор. Главной темой в научной работе Кокса всегда было изучение ферментов, участвующих в генетической рекомбинации.

В университете Висконсина Кокс руководит большой и активной научной группой,

работающей в области энзимологии, топологии и энергетики рекомбинации генов. Основные темы научных работ его сотрудников посвящены механизмам обмена нитей ДНК при участии белка RecA, роли АТФ в системе RecA и регуляции рекомбинационной репарации. Частично группа занята изучением клеток *Deinococcus radiodurans*, обладающих удивительно мощной системой репарации, и применением этой системы репарации в биотехнологии.

На протяжении последней более четверти века Кокс совместно с Д. Нельсоном преподает

курс биохимии студентам и читает лекции по структуре и топологии ДНК, ДНК-белковым взаимодействиям и биохимии рекомбинации аспирантам. Аспиранты первого года слушают его курс о профессиональной ответственности будущих ученых. За свои научные исследования и преподавательскую деятельность Кокс был награжден премией Дрейфуса для педагогов-ученых и премией компании Eli Lilly по биологической химии в 1989 г. Хобби Кокса – садоводство, коллекционирование вин и участие в планировании зданий для научных исследований.

В наступившем XXI в. при получении классического естественно-научного образования не уделяется должного внимания философии науки и философским обоснованиям научных теорий. Поскольку предполагается, что в будущем вы будете заниматься научной деятельностью, здесь уместно еще раз остановиться на сути таких понятий, как **наука**, **ученый** и **научный метод**.

Наука подразумевает одновременно способ наблюдения за окружающим миром, а также сумму данных и теорий, вытекающих из этого наблюдения. Мощь науки и ее успех напрямую следуют из тех ее положений, которые можно проверить, исследуя природные явления, которые можно наблюдать, измерить и воспроизвести, или предлагая теории, имеющие предсказательную силу. Прогресс науки базируется на фундаментальном принципе, о котором редко говорят, но который чрезвычайно важен; этот принцип заключается в постоянстве законов, управляющих силами и явлениями во всей Вселенной. Лауреат Нобелевской премии Жак Моно назвал этот принцип «постулатом объективности природы». Таким образом, мир вокруг нас можно понять, применив научный метод, как это делают при научных исследованиях. Если бы мир не подчинялся строгим законам, наука не могла бы успешно развиваться. Кроме постулата объективности наука не выдвигает никаких предположений об окружающем мире, которые не подлежали бы изменению и уточнению. Приемлимы лишь те научные идеи или предположения, которые (1) воспроизводимо подтверждаются и (2) могут быть использованы для точного предсказания новых явлений.

Научные идеи могут быть воплощены в разные формы, причем смысл терминов, которые ученые при этом используют, в значительной степени отличается от того, что под этими терминами понимают люди, не занятые научной деятельностью. Так, *гипотезой* называют идею или предположение, которое обеспечивает разумное и проверяемое объяснение одного или нескольких наблюдений, но которое может не иметь большого числа экспериментальных подтверждений. *Научная теория* — это уже нечто большее; это идея, которая в достаточной степени подтверждается экспериментальным путем и объясняет основную часть наблюдений определенного рода.

Научная теория всегда основана на фактах и может быть проверена, поэтому теорию можно применить при дальнейших исследованиях. Если научная теория многократно проверена на фактах и подтверждена по многим параметрам, ее можно принять как научный факт.

Можно сказать, что научные идеи составляют содержание научных статей, которые публикуются в научных журналах по рецензии других ученых. Ежегодно в мире в 16 000 научных журналов публикуется около 1,4 миллиона статей, и этой информацией может воспользоваться любой человек.

Ученые — это люди, которые применяют научный метод к познанию окружающего мира. Ученым не становятся просто при получении научной степени или звания, а отсутствие таковых не мешает человеку внести весомый вклад в развитие науки. Настоящему ученому свойственно пытаться сформулировать какую-либо гипотезу в ответ на появление новых данных. Принимаемые научные гипотезы должны основываться на измеряемых и воспроизводимых наблюдениях, причем излагать эти наблюдения ученый должен абсолютно честно.

Научный метод включает целый набор путей исследования, причем любой путь может привести к научному открытию. Путь *от гипотезы до эксперимента* — ученый формулирует гипотезу и проверяет ее экспериментальным методом. Многие биохимические процессы, с которыми биохимики сталкиваются в своей ежедневной работе, были открыты именно таким образом. Джеймс Уотсон и Френсис Крик установили структуру ДНК; благодаря этому открытию была сформулирована гипотеза о том, что спаривание оснований ДНК лежит в основе передачи генетической информации при синтезе полинуклеотидных последовательностей. Эта гипотеза помогла в открытии РНК- и ДНК-полимераз.

Уотсон и Крик открыли структуру ДНК, используя метод *моделирования и расчетов*. Они не проводили никаких самостоятельных экспериментов, а использовали экспериментальные данные, полученные ранее другими учеными. Некоторые смелые ученые в качестве научного метода избрали *метод наблюдений*. Открытия, сделанные известными путешественниками, в том числе Чарльзом Дарвином при путешествии на «Бигле» в 1831 г., позволили создать карту нашей планеты, описать ее обитателей и изменили

наши представления об окружающем мире. Современные ученые, исследующие морские глубины или посылающие ракеты к другим планетам, идут тем же путем познания. Еще один путь, напоминающий путь гипотезы–эксперимента, основан на методе *гипотеза–дедукция*. Крик считал, что должна существовать молекула-посредник, отвечающая за перенос информации матричной РНК в белок. Эта гениальная гипотеза привела к открытию Маломом Хогландом и Полом Замечником транспортных РНК.

Не все научные открытия совершаются «по плану»; часто важную роль играет *интуиция* (*прозорливость*) ученого. Открытия пенициллина Александром Флемингом в 1928 г. и каталитической активности РНК Томасом Чеком в начале 1980-х гг. до некоторой степени были счастливыми случайностями, однако эти ученые были готовы к восприятию и использованию своих открытий. Немаловажную роль может сыграть и *вдохновение*. Так, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который теперь зани-

мает центральное место в биотехнологических исследованиях, был создан Кэри Маллисом в порыве вдохновения во время путешествия по Северной Калифорнии в 1983 г.

Перечисленные нами пути к научному открытию могут показаться никак не связанными между собой, однако у них есть важные общие свойства. Все они направлены на изучение природы. Все они опираются на *воспроизводимое наблюдение* и (или) *эксперимент*. Все идеи и экспериментальные подтверждения, связанные с научным поиском, могут быть проверены и воспроизведены учеными в любой точке света. Всеми научными гипотезами и открытиями могут воспользоваться другие ученые для создания новых гипотез и совершения новых открытий. Все они приносят информацию, которая соответствующим образом пополняет информационное богатство научного знания. Изучение устройства мира – тяжелая работа. Но нет более захватывающего и достойного занятия, чем пытаться хотя бы частично понять устройство мира.

Первое издание книги «*Principles of Biochemistry*», написанной Альбертом Ленинджером 25 лет назад, послужило отправной точкой и моделью для последующих четырех изданий. За четверть века биохимические знания неизмеримо расширились. Двадцать пять лет назад не был расшифрован ни один геном, не был проведен рентгеноструктурный анализ ни одного мембранного белка и не существовало ни одной нокаутной мыши. Только-только были открыты рибозимы и внедрена технология ПЦР, а археи были признаны отдельным царством организмов. Сегодня новые генетические последовательности публикуются еженедельно, а новые белковые структуры появляются и того чаще; ученые создали тысячи разных нокаутных животных, что способствует успешному развитию биохимии, физиологии и медицины. В этом пятом издании книги представлены фотографии 31 Нобелевского лауреата, которые получили свои премии в области химии, физиологии или медицины уже после выхода в свет первого издания.

Одной из задач каждого последующего издания было в какой-то степени отразить поток поступающей новой информации, но при этом не перегрузить издание, ведь по этой книге студенты часто впервые знакомятся с биохимией. Тщательный отбор информации позволил нам изложить основные принципы биохимии и при этом поведать о захватывающих научных достижениях последних лет, об их значении для будущего человечества. Пример такого удивительного исследования иллюстрирует рентгеноструктурный анализ РНК-полимеразы, когда в атомном разрешении удалось идентифицировать информационную функцию ДНК,

РНК и белка в ключевой момент передачи информации.

Мы стоим на пороге появления новой молекулярной физиологии, в рамках которой такие процессы, как активация мембранных процессов, секреция, действие гормонов, зрение, обоняние, вкусовые реакции, дыхание, мышечные сокращения и движение клеток, будут объяснены на молекулярном уровне и станут доступны для генетического анализа и фармакологического воздействия. Знание молекулярного строения сложных мембранных комплексов, например ответственных за окислительное фосфорилирование или фотофосфорилирование, безусловно, позволит глубже понять эти столь важные для жизни процессы. (Такие изменения вызывают у нас желание помолодеть и вернуться к началу нашей научной и педагогической карьеры. Ведь наша книга — не единственная вещь, которая постарела за все эти годы.)

В каждом новом издании мы старались сохранить те достоинства книги Ленинджера, которые сделали ее классическим учебником, а именно, четкое изложение, тщательное разъяснение трудных вопросов и описание тех методов, которыми пользуются современные биохимики. Как авторы мы работаем вместе уже более 25 лет и как преподаватели — уже почти столько же. За все эти годы тысячи наших студентов в университете Висконсин-Мэдисон были неиссякаемым источником идей о том, как сделать курс современной биохимии более понятным. Наши студенты обучали и вдохновляли нас. Мы очень надеемся, что эта книга, посвященная двадцатипятилетней годовщине первого издания, поможет обучить и вдохновить новых студентов, изучающих биохимию, и, возможно, заставит некоторых из них полюбить биохимию так, как любим ее мы.

Эта книга — плод коллективного труда, и ее выход в свет был бы невозможен без поддержки сотрудников издательства Freeman and Company, которые поддерживали нас на всем пути создания книги. Ренди Россиньоль (главный редактор) и Кейт Ар (ответственный редактор) организовывали рецензии, внесли множество ценных предложений, подбадривали нас, вели к цели и героически (хотя и не всегда успешно) заставляли нас укладываться в отведенные временные рамки. Наш выдающийся редактор Лиз Геллер каким-то образом умудрялась продвигать выпуск книги, несмотря на все пропущенные сроки и внезапные изменения, причем делала это с ее всегдашним обаянием и мастерством. Мы благодарны Вики Томаселли за дизайн книги и Марше Коэн за замечательный макет. Нам вновь повезло встретиться в работе с выдающимся техническим редактором Линдой Стрендж, которая подготовила выпуск всех пяти изданий *Principles of Biochemistry* (а также два ранних издания *Biochemistry* самого Ленинджера). Ее помощь бесценна, и любое ее прикосновение к тексту всегда его улучшает. Нам также вновь повезло работать вместе с Морганом Райаном, который помогал нам при выпуске двух предыдущих изданий книги. Мы благодарим Дену Дигильо Бетц за ее помощь в подборе и размещении фотографий и Ника Тимошко и Уитни Кленч за координацию работы всех участников проекта. Мы также выражаем благодарность директору по маркетингу Дебби Клер за организацию продажи и маркетинга книги и за ее прекрасный юмор.

В Мэдисоне нашим первым редактором и критиком при подготовке всех изданий книги была и остается Брук Солтведт. Она первой просматривала главы рукописи, помогала в подготовке текста и рисунков, следила за согласованием отдельных фрагментов, за единством номенклатуры и ласково, но настойчиво нас подгоняла. Мы благодарим Шелли Лузетти, теперь работающую в университете Нью-Мехико, которая, как и при подготовке предыдущего издания книги, прочла каждое слово корректуры, нашла много ошибок и внесла ценные предложения, которые улучшили книгу.

Новое оформление книги, включая изображение новых молекулярных структур, выполнено

здесь, в Мэдисоне, Адамом Стейнбергом, который внес много полезных предложений, позволивших сделать изображения более наглядными. В настоящем издании также есть изображения молекул, выполненные для третьего и четвертого изданий Жан-Ивом Стро — нашим коллегой из Мэдисона. Нам очень повезло, что с нами в работе принимали участие такие талантливые люди, как Брук, Шелли, Адам и Жан-Ив.

Мы также очень признательны Брайану Уайту из Массачусетского университета в Бостоне, который составил новые задачи по анализу экспериментальных данных для каждой главы книги.

Многие наши коллеги проявляли большой интерес к ходу выполнения проекта и оказали нам большую помощь, внося полезные комментарии. Особую благодарность мы хотим выразить Лоренсу Андерсону из университета Висконсин-Мэдисон, Джеффри Д. Эско из Калифорнийского университета в Сан-Диего, Джеку Киршу и его студентам из Калифорнийского университета в Беркли, а также Дане Эшвод, Шиу-Чуан (Шерил) Тсай, Майклу Г. Кумски и их коллегам (перечисленным ниже) из Калифорнийского университета в Ирвайне. Многие помогли нам подготовить и выпустить это пятое издание книги, внося полезные советы, комментарии и замечания. Мы признательны всем, кого мы включили в этот список:

Ричард М. Амазино, *Университет Висконсин-Мэдисон*

Луиза Е. Андерсон, *Университет Иллинойса, Чикаго*

Шерил Бейли, *Университет Небраски, Линкольн*

Кеннет Балазович, *Университет Мичигана*

Томас О. Болдуин, *Университет Аризоны*

Вай Бандариан, *Университет Аризоны*

Юджин Барбер, *Университет Рочестера*

Себастьян И. Беднарек, *Университет Висконсин-Мэдисон*

Рамачандра Бхат, *Университет Линкольна*

Джеймс Бланкеншип, *Корнелльский университет*

Сандра Дж. Бонетти, *Университет Колорадо, Пуэбло*

Барбара Боуман, *Калифорнийский университет, Беркли*

Скотт Д. Бриггс, *Университет Пердью*
 Джефф Бродски, *Университет Питтсбурга*
 Бен Колдуэлл, *Западный университет Миссури*
 Дэвид Камерини, *Калифорнийский университет,*
Ирвайн
 Джеффри Колберг, *Калифорнийский университет,*
Лонг-Бич
 Гийом Шанфро, *Калифорнийский университет,*
Лос-Анджелес
 Мелани Кокко, *Калифорнийский университет,*
Ирвайн
 Ким Д. Коллинз, *Университет Мэриленда*
 Шарль Т. Дамерон, *Университет Дюкена*
 Ричард С. Эйзенштейн, *Университет*
Висконсин-Мэдисон
 Джеральд В. Фейгенсон, *Корнелльский*
университет
 Роберт Г. Филлингейм, *Университет*
Висконсин-Мэдисон
 Брайан Фокс, *Университет Висконсин-Мэдисон*
 Джеральд Д. Френкель, *Университет Рутгерса*
 Перри Фрай, *Университет Висконсин-Мэдисон*
 Дэвид Е. Грэхем, *Техасский университет,*
Остин
 Уильям Дж. Граймс, *Университет Аризоны*
 Мартин Ганн, *Техасский АМ университет*
 Оливия Хэнсон, *Университет Центральной*
Оклахомы
 Эми Харк, *Муленберг колледж*
 Шон В. Хернандес, *Университет Висконсин-*
Мэдисон
 Питер Хинкл, *Корнелльский университет*
 П. Шинг Хо, *Университет Орегона*
 Чарльз Г. Хутстратен, *Университет Мичигана*
 Джервальд Йогл, *Университет Броуна*
 Сэр Ханс Корнберг, *Университет Бостона*
 Боб Лэндик, *Университет Висконсин-Мэдисон*
 Патрик Д. Ларкин, *Техасский АМ университет,*
Корпус-Кристи
 Райан П. Лиегель, *Университет*
Висконсин-Мэдисон
 Мария Линдер, *Калифорнийский университет,*
Фуллerton
 Энди С. ЛиВанг, *Техасский АМ университет*
 Джон Мейкемсон, *Международный*
университет Флориды
 Джон С. Мэттьюс, *Фармакологический факультет*
университета Миссисипи
 Бенжамин Дж. МакФарланд, *Тихоокеанский*
университет Сизтла

Анант Менон, *Медицинский колледж*
Вейла Корнелла
 Сабеха Мершант, *Калифорнийский университет,*
Лос-Анджелес
 Скотт С. Мор, *Университет Бостона*
 Кимберли Моури, *Университет Броуна*
 Лейша Муллинс, *Техасский АМ университет*
 Севайт Негаш, *Калифорнийский университет,*
Лонг-Бич
 Аллен В. Нихолсон, *Университет Темпл*
 Хироши Никайдо, *Калифорнийский университет,*
Беркли
 Джеймс Нтамби, *Университет*
Висконсин-Мэдисон
 Тимоти Ф. Осборн, *Калифорнийский университет,*
Ирвайн
 Жозе Р. Перес-Кастинейра, *Университет Севильи,*
Испания
 Терри Платт, *Университет Рочестера*
 Венди Погозельски, *Университет Нью-Йорка,*
Генезео
 Джонатан Поппер, *Университет*
Висконсин-Мэдисон
 Томас Паулос, *Университет Висконсин-Мэдисон*
 Джек Прейсс, *Университет Мичигана*
 Анна Родаминска-Пандия, *Университет*
Арканзаса
 Рон Райнес, *Университет Висконсин-Мэдисон*
 Том А. Рапопорт, *Медицинский факультет*
Гарварда
 Джейсон Дж. Реддик, *Университет Северной*
Каролины, Гринсборо
 Мэри Робертс, *Бостонский колледж*
 Ингрид К. Руф, *Калифорнийский университет,*
Ирвайн
 Абузар Сулеймани, *Тегеранский университет,*
Иран
 Марк Спаллер, *Университет Уэйна*
 Стефен Спиро, *Техасский университет, Даллас*
 Нарасимха Шрирама, *Университет Колорадо*
 Ион Д. Стюарт, *Университет Флориды*
 Кони Стоун, *Калифорнийский университет,*
Станислос
 Ион Р. Сталтсфус, *Университет Мичигана*
 Джереми Торнер, *Калифорнийский университет,*
Беркли
 Дин Р. Толан, *Бостонский университет*
 Сандра Л. Турчи, *Университет Миллерсвилля*
 Мануэль Вареле, *Восточный университет*
Нью-Мехико

Боб Уорбургон, *Университет Шеперда*

Трейси Уор, *Сайлемский колледж*

Сьюзан Уэйнтрауб, *Техасский университет, Центр наук о здоровье*

Майкл Яффе, *Массачусетский технологический институт*

Нам просто не хватит места для того, чтобы поблагодарить всех наших людей, чью помощь мы чувствовали при подготовке этой книги к изданию. Мы выражаем глубокую признательность всем, и настоящим выражением нашей благодарности может служить этот труд, доведенный до логического завершения. Безусловно, мы берем на себя всю ответственность за любые ошибки и неточности, которые могут встретиться в книге.

Мы еще раз хотим поблагодарить наших студентов в Университете Висконсин-Мэдисон за их многочисленные предложения и комментарии. Если в книге что-то не так, они, без сомнения, нам об этом сообщат. Мы благодарим студентов

и сотрудников наших научных групп, а также сотрудников Центра биологического образования, которые помогли нам правильно распорядиться нашим временем; мы благодарим наших коллег из биохимического факультета университета Висконсин-Мэдисон за их советы и критические замечания; мы также благодарим всех студентов и преподавателей, которые прислали нам свои комментарии и предложения. Мы надеемся, что наши читатели и в дальнейшем будут продолжать вносить свой вклад в следующие издания книги.

Наконец, мы выражаем глубочайшую признательность нашим женам, Брук и Бет, и нашим семьям, которые продемонстрировали удивительное терпение и оказали нам большую поддержку при написании этой книги.

Дэвид Л. Нельсон
Майкл М. Кокс
Мэдисон, Висконсин,
Январь 2008 г.

Клетка — это атом в биологии... Чтобы понять, что такое жизнь, нужно изучить клетку и определить ее строение с тем, чтобы познать закономерности жизнедеятельности любой клетки, найти те различия, которые отвечают за ее специфические функции.

Франсуа Жакоб, Логика жизни: история наследования, 1970

1

ОСНОВЫ БИОХИМИИ

- 1.1 Принципы организации клетки 17
- 1.2 Химические основы биохимии 28
- 1.3 Физические основы биохимии 40
- 1.4 Генетические основы биохимии 50
- 1.5 Эволюционные основы биохимии 54

Примерно 15–20 миллиардов лет назад в результате взрыва, сопровождавшегося извержением раскаленных субатомных частиц с очень высокой энергией, возникла Вселенная. Простейшие элементы (водород и гелий) образовались за считанные секунды. По мере расширения и остывания Вселенной материя под действием гравитации конденсировалась, и возникли звезды. Некоторые из них становились огромными и взрывались как сверхновые звезды, высвобождая энергию, необходимую для слияния атомных ядер и образования разнообразных химических элементов. Так несколько миллиардов лет назад возникла Земля с теми химическими элементами, которые сейчас на ней существуют. Жизнь возникла около четырех миллиардов лет назад: появились простые микроорганизмы, способные добывать энергию из химических соединений, позже — из солнечного света и использовать ее для синтеза великого множества сложных **биомолекул**, используя простые элементы и соединения, находящиеся на поверхности Земли.

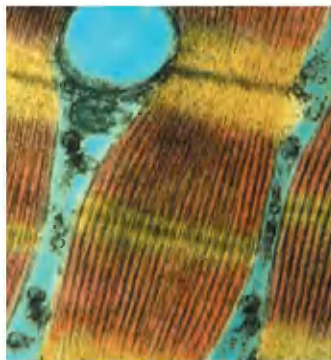
Биохимия изучает, каким образом замечательные свойства живых организмов возникают из тысяч различных неживых молекул. Выделенные в индивидуальном состоянии и исследован-

ные, эти молекулы подчиняются всем физическим и химическим законам, описывающим поведение неживой материи; это справедливо для всех процессов, протекающих в живых организмах. Биохимические исследования позволяют понять, каким образом неживые молекулы в составе живых организмов взаимодействуют между собой, способствуя сохранению и непрерывному поддержанию жизни, причем и взаимодействия происходят строго в соответствии с физическими и химическими законами, управляющими неживой материей.

Тем не менее живые организмы обладают особыми признаками, отличающими их от других материальных объектов. Каковы же эти отличительные признаки?

Сложность химического состава и строения на микроуровне. Тысячи различных молекул участвуют в составлении замысловатой внутренней структуры клетки (**рис. 1-1, а**). Среди них встречаются очень длинные биополимеры (каждая макромолекула содержит характерный набор субъединиц и имеет уникальную трехмерную структуру), а также способность к высокоспецифическому, т. е. избирательному, связыванию с другими молекулами внутри клетки.

Благодаря получению, преобразованию и использованию энергии окружающей среды (**рис. 1-1, б**) организм может создавать и поддерживать свои внутренние структуры и выполнять механическую, химическую,



а



б



в

Рис. 1-1. Некоторые признаки живой материи. а) Электронная микрофотография окрашенного тонкого среза мышечной ткани позвоночного иллюстрирует сложность живой ткани на микроуровне; б) степной сокол получает необходимые ему питательные вещества, поедая более мелких птиц; в) биологическое воспроизведение характеризуется изумительной точностью.

осмотическую и электрическую работу. Это противодействует стремлению всей неживой материи к распаду и переходу в неупорядоченное состояние. Эти противоположные процессы уравнивают друг друга.

Способность к точному самовоспроизведению (рис. 1-1, в). Из единственной бактериальной клетки, помещенной в стерильную питательную среду, за 24 ч может возникнуть миллиард идентичных «дочерних» клеток. Каждая клетка содержит тысячи различных молекул, некоторые из них имеют чрезвычайно сложную структуру, но тем не менее каждая бактерия является точной копией оригинала и ее строение полностью определяется информацией, содержащейся в генетическом материале исходной клетки.

Механизмы восприятия изменений в окружающей среде непрерывно приводят организм в соответствие с условиями среды путем адаптации внутренней химической структуры или изменения положения в окружающей среде.

Специфические функции всех компонентов живого организма и регуляция их взаимоотношений. Это отличительная черта не только макроструктур, таких как стебель и лист или сердце и легкое, но также внутриклеточных

точных микроструктур и индивидуальных химических соединений. Взаимодействие химических веществ в живом организме динамично, изменения в одном соединении вызывают скоординированные или компенсирующие изменения в других, причем вместе весь ансамбль приобретает черты, отличные от тех, что присущи его отдельным частям. Набор молекул выполняет некую программу, конечный результат которой состоит в воспроизведении этой программы и самого набора молекул, т. е. жизни.

Способность изменяться со временем путем последовательной эволюции. Организмы очень понемногу изменяют наследуемые стратегии выживания в соответствии с изменениями внешних условий. Результатом бесконечной эволюции является огромное многообразие форм жизни, внешне весьма различных (рис. 1-2), но в основе своей связанных общим происхождением. Общность всех живых организмов на молекулярном уровне выражается в сходстве последовательностей генов и структуры белков.

Несмотря на единство жизни, основополагающие обобщения для всех живых организмов сделать сложно. Разнообразие жизни на Земле огромно. Диапазон условий существования организмов огромен — от горячих источников до арктической



Рис. 1-2. Различные живые организмы имеют одинаковое химическое строение. Птицы, звери, растения, почвенные микроорганизмы и человек построены из одинаковых структурных единиц (клеток) и макромолекул (ДНК, РНК, белки), построенных из мономерных единиц одинакового типа (нуклеотиды, аминокислоты). Живые организмы используют одни и те же метаболические пути для синтеза компонентов клетки, у них общий генетический код, и они происходят от одних и тех же эволюционных предков. Приведен фрагмент картины Яна ван Кесселя мл. (1626–1679) «Сады Эдема».

тундры и от кишечника животных до студенческих общежитий — тем не менее специфическая биохимическая адаптация достигается в пределах общей химической структуры. Для большей ясности в данной книге мы иногда используем обобщения, которые, возможно, несовершенны, но полезны. Кроме того, мы часто обращаем внимание на исключения, которые по возможности подкрепляем примерами.

Биохимия на молекулярном уровне описывает структуру, механизмы и химические процессы, свойственные всем организмам, и формулирует принципы организации, лежащие в основе любых форм жизни, которые можно назвать принципами *молекулярной логики жизни*. Хотя биохимия вносит значительный вклад в фундаментальную и прикладную медицину, сельское хозяйство, систему питания и промышленность, ее основной задачей является изучение самой жизни.

В данной вступительной главе мы кратко остановимся на описании клеточных, химических, физических (термодинамических) и гене-

тических основ биохимии и общего принципа эволюции — изменения свойств живых клеток на протяжении поколений. При изучении книги полезно возвращаться к данной главе для восстановления в памяти изложенного здесь фундаментального материала.

1.1. Принципы организации клетки

Единство и различие организмов очевидно уже на клеточном уровне. Самые маленькие организмы состоят из одной клетки и имеют микроскопические размеры. Более крупные многоклеточные организмы содержат много разных типов клеток, отличающихся по размеру, форме и специфическим функциям. Несмотря на эти очевидные различия, все клетки как простейших, так и наиболее сложных организмов имеют общие фундаментальные свойства, которые можно исследовать на биохимическом уровне.

Клетки являются структурными и функциональными единицами всех живых организмов

Клетки всех видов имеют общие особенности строения (**рис. 1-3**). **Плазматическая мембрана** ограничивает клетку, отделяя ее содержимое от окружающей среды. Мембрана состоит из молекул липидов и белков, образующих тонкий, плотный, пластичный, гидрофобный барьер вокруг клетки. Мембрана препятствует свободному проникновению в клетку неорганических ионов и большинства других заряженных или полярных соединений. Прохождение определенных ионов и молекул обеспечивают транспортные белки внутри плазматической мембраны; рецепторные белки передают в клетку сигналы; мембранные ферменты участвуют в некоторых метаболических реакциях. Поскольку отдельные липиды и белки в плазматической мембране не связаны между собой ковалентными связями, вся структура отличается замечательной гибкостью, позволяющей клетке изменять свою форму и размер. По мере роста клетки в плазматическую мембрану встраиваются вновь образующиеся молекулы липидов и белков. При делении каждой клетки образуются две новые, каждая из которых окружена собственной мембраной. Рост и деление (дробление) клетки происходят без нарушения целостности мембраны.

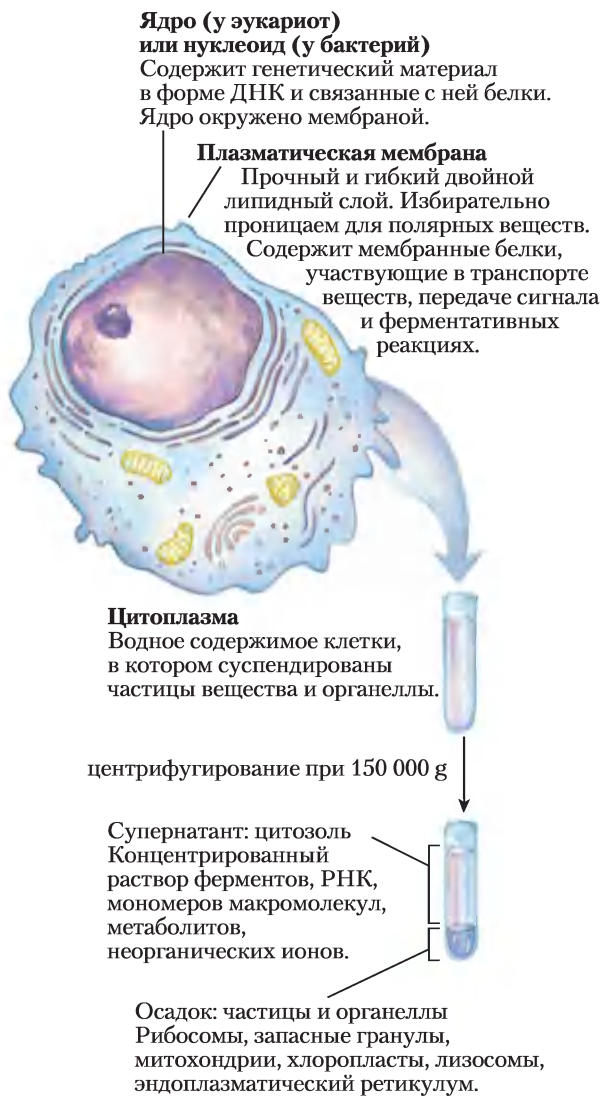


Рис. 1-3. Универсальные элементы строения живой клетки. Все клетки имеют ядро или нуклеоид, плазматическую мембрану и цитоплазму. Цитозолем называют часть цитоплазмы, которая остается в супернатанте после центрифугирования клеточного экстракта при 150 000 g в течение 1 ч.

Внутреннее пространство, ограниченное плазматической мембраной, заполнено **цитоплазмой** (рис. 1-3), представляющей собой водную среду (**цитозоль**) с множеством частиц, выполняющих разнообразные функции. Цитозоль — это концентрированный раствор, содержащий ферменты и кодирующие их молекулы РНК, строительные блоки для этих макромолекул (аминокислоты и нуклеотиды), сотни небольших органических молекул (**метаболитов** — проме-

жуточных продуктов биосинтеза и распада), **коферменты** для многих ферментативных реакций, неорганические ионы и такие надмолекулярные структуры, как **рибосомы**, где происходит синтез белков, и **протеасомы**, где разрушаются те белки, в которых клетка больше не нуждается.

Все клетки, по крайней мере в определенный период своей жизни имеют **ядро** или **нуклеоид**, в котором хранится и реплицируется **геном** — полный набор генов, состоящих из ДНК. У бактерий и архей нуклеоид не отделяется от цитоплазмы мембраной. У большой группы **эукариот** (от греч. *eu* — истинный и *karyon* — ядро) ядро состоит из ядерного материала, заключенного в двухслойную мембрану — ядерную оболочку. Клетки, имеющие ядерную оболочку, называют **эукариотическими**. Все микроорганизмы, не имеющие ядерной оболочки, раньше называли **прокариотами** (от греч. *pro* — до, *karyon* — ядро), однако теперь среди них выделяют отдельно домен архей и домен бактерий (см. ниже).

Размеры клеток лимитированы диффузией кислорода

Большинство клеток имеют микроскопические размеры и невидимы невооруженным глазом. Диаметр клеток животных и растений — от 5 до 100 мкм, а длина большинства клеток одноклеточных микроорганизмов обычно не превышает 1–2 мкм. Что ограничивает размеры клетки? Нижний предел, по всей видимости, определяется минимальным количеством необходимых клетке биомолекул разных видов. Самые маленькие клетки бактерий — микоплазмы — имеют диаметр 300 нм и объем около 10^{-14} мл. Бактериальная рибосома в наибольшем измерении имеет размер 20 нм, следовательно, несколько рибосом занимают значительную часть объема клетки микоплазмы.

Верхний предел размера клетки, вероятно, определяется скоростью диффузии растворенных веществ в водной среде. Например, бактериальные клетки получают энергию в реакциях, протекающих с потреблением молекулярного кислорода, который поступает из окружающего пространства через плазматическую мембрану путем диффузии. Клетка настолько мала, а отношение площади ее поверхности к объему настолько велико, что диффундирующий кислород легко достигает любого участка цитоплазмы. Однако по мере увеличения размеров клетки снижается

отношение площади ее поверхности к объему, и потребление кислорода в реакциях метаболизма увеличивается быстрее, чем количество кислорода, поступающего в клетку в результате диффузии. Таким образом, начиная с определенного размера клеток метаболизм с использованием O_2 становится невозможным, что и определяет теоретический верхний предел размера клетки.

Существуют три царства живых организмов

Каждый живой организм можно отнести к одной из трех больших групп (доменов) – трех ветвей эволюции, происходящих от общего предшественника (рис. 1-4). По биохимическим свойствам различают две большие группы одноклеточных микроорганизмов – **бактерии и археи**. Бактерии населяют почву, поверхностные водоемы, а также ткани живых или разлагающихся организмов. Большинство хорошо изученных бактерий, в том числе *Escherichia coli*, относятся к эубактериям.

Археи были выделены в отдельный домен Карлом Вёзе в 1980-х гг. Многие из этих организмов живут в экстремальных природных условиях, например в соленых озерах, горячих источниках, болотах с очень высокой кислотностью воды и в глубинах океана. Существующие данные позволяют предположить, что археи и бактерии выделились в отдельные ветви на ранних этапах эволюции. Все эукариотические организмы составляют третий домен – **эукариоты**, они происходят из той же ветви эволюции, которая дала начало археям. Таким образом, археи являются более близкими родственниками эукариотам, чем бактериям.

Представителей доменов архей и бактерий разделяют на подгруппы в зависимости от условий их обитания. **Аэробные** организмы, населяющие места с достаточным содержанием кислорода, могут получать энергию от переноса электронов с топливных молекул на кислород. Микроорганизмы, адаптированные к **анаэробным** условиям, где кислород практически отсут-

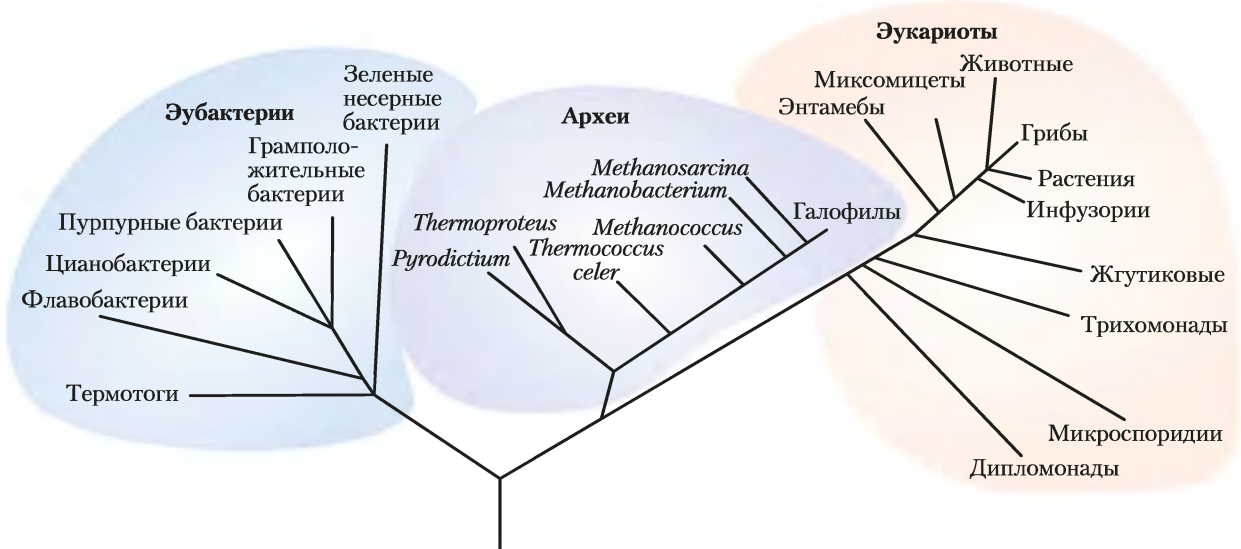


Рис. 1-4. Филогения трех царств живых организмов. Филогенетическое родство часто иллюстрируют с помощью подобного «фамильного древа». Основой для построения этого древа является сходство нуклеотидных последовательностей рибосомной РНК внутри каждой группы; чем больше сходство последовательностей, тем ближе располагаются ветви, так что расстояние между двумя ветвями отражает степень расхождения двух последовательностей. Филогенетические деревья также могут быть основаны на сходстве последовательности аминокислот в отдельном белке. Например, на основе сравнения последовательностей белка GroEL (бактериальный белок, который участвует в сборке белков) построено древо, показанное на рис. 3-32. На рис. 3-33 представлено «консенсусное» древо, при построении которого для получения более точных результатов эволюционного сродства групп организмов использованы несколько параметров сравнения.

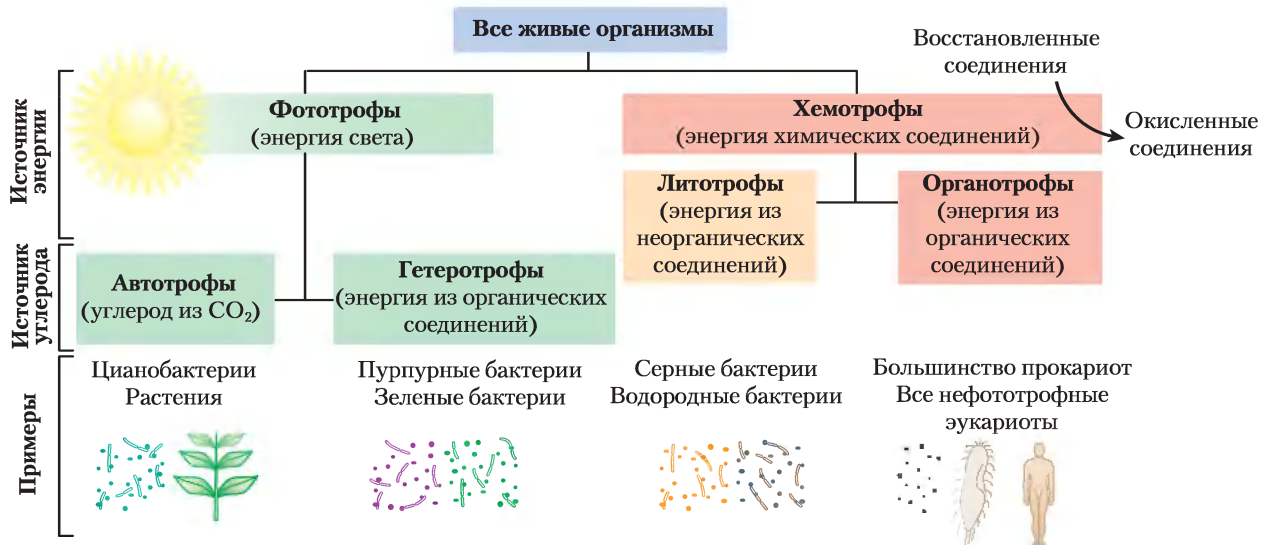


Рис. 1-5. Организмы можно классифицировать в соответствии с теми источниками энергии (солнечный свет либо окисление химических соединений) и углерода, которые они используют для синтеза веществ в клетке.

ствует, получают энергию путем переноса электронов на нитрат (с образованием N₂), сульфат (с образованием H₂S) или CO₂ (с образованием CH₄). Многие организмы, эволюционировавшие в анаэробных условиях, являются *облигатными* (строгими) анаэробами: в присутствии кислорода они погибают. Другие — *факультативные* анаэробы, они могут жить и без кислорода, и в его присутствии.

Организмы можно классифицировать в соответствии с тем способом, с помощью которого они получают энергию и углерод, необходимые для синтеза клеточного вещества (рис. 1-5). В зависимости от источника энергии выделяют две большие группы организмов: **фототрофы** (от греч. *trophe* — питание) используют солнечный свет, а **хемотротрофы** добывают энергию путем окисления топливных молекул. Группа хемотротрофных организмов, называемых **литотрофами**, способна окислять неорганические вещества: HS⁻ до элементарной серы S⁰, S⁰ до SO₄²⁻, NO₂⁻ до NO₃⁻, а Fe²⁺ до Fe³⁺. **Органотрофы** окисляют различные органические вещества, находящиеся в окружающей их среде. Фототрофы и хемотротрофы также можно разделить на группы в соответствии с тем, могут ли они использовать в качестве источника углерода CO₂ (**автотрофы**) или должны получать углерод из органических питательных веществ (**гетеротрофы**).

Бактерия *Escherichia coli* — наиболее изученная бактерия

В строении клеток бактерий много общего, но есть и групповые особенности (рис. 1-6). В норме *E. coli* является безопасным обитателем кишечника человека. Длина ее клетки около 2 мкм, диаметр чуть менее 1 мкм. Клетка защищена внешней мембраной, а внутренняя плазматическая мембрана ограничивает пространство, в котором заключены цитоплазма и нуклеоид. Пространство между внешней и внутренней мембранами занято тонким, но прочным слоем полимеров, называемых пептидогликанами, которые придают клетке жесткость и определенную форму. Плазматическая мембрана вместе с внешними по отношению к ней слоями образует **клеточную оболочку**. Прочность клеткам архей придают полимеры другого типа — псевдопептидогликаны. Плазматическая мембрана бактерий состоит из тонкого двойного слоя липидов с белковыми включениями. Мембраны архей имеют аналогичное строение, однако их липиды поразительным образом отличаются от липидов бактерий (см. рис. 10-12).

В цитоплазме *E. coli* содержится около 15 000 рибосом, от десяти до тысячи копий каждого из примерно 1000 различных ферментов, а также

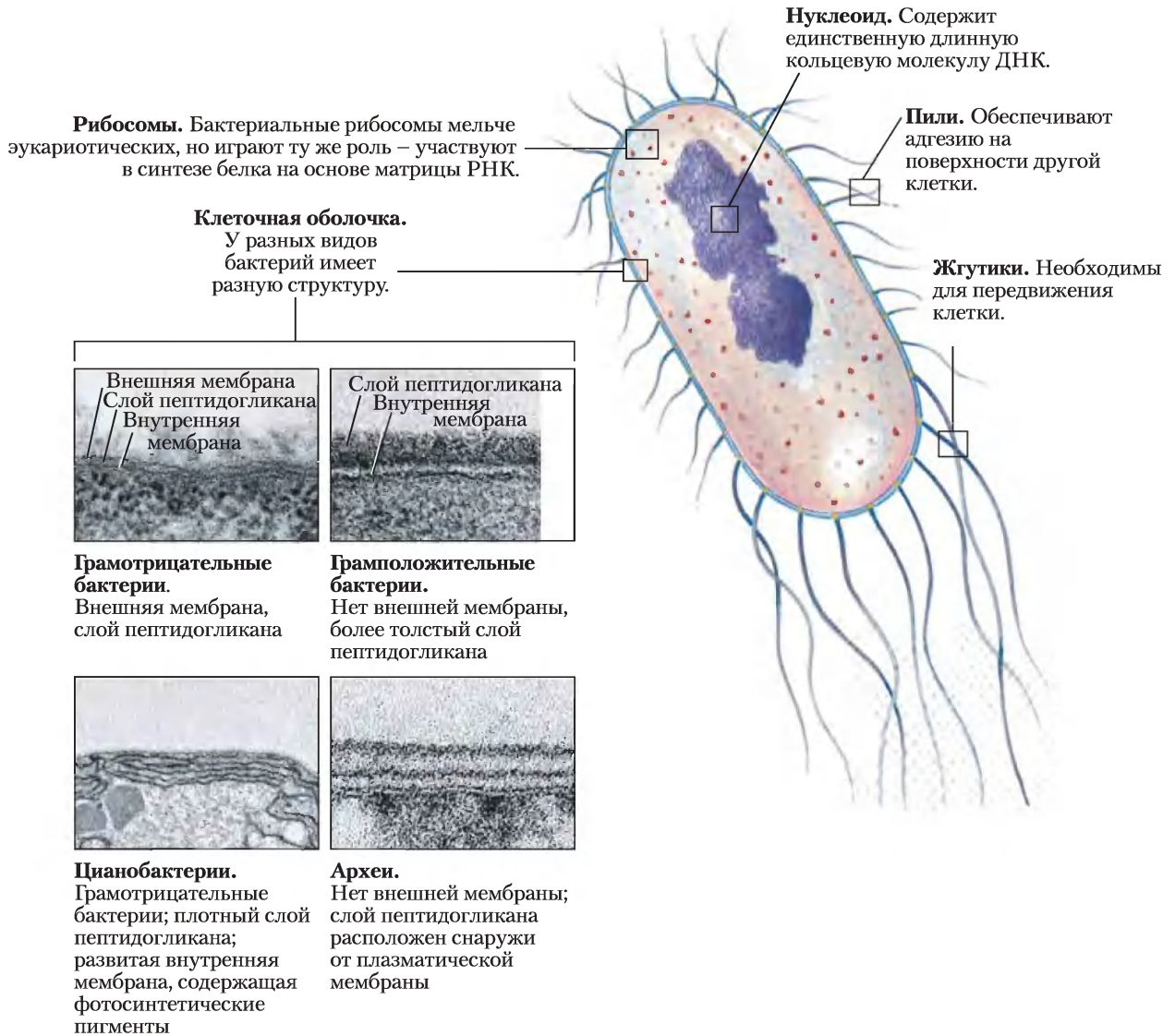
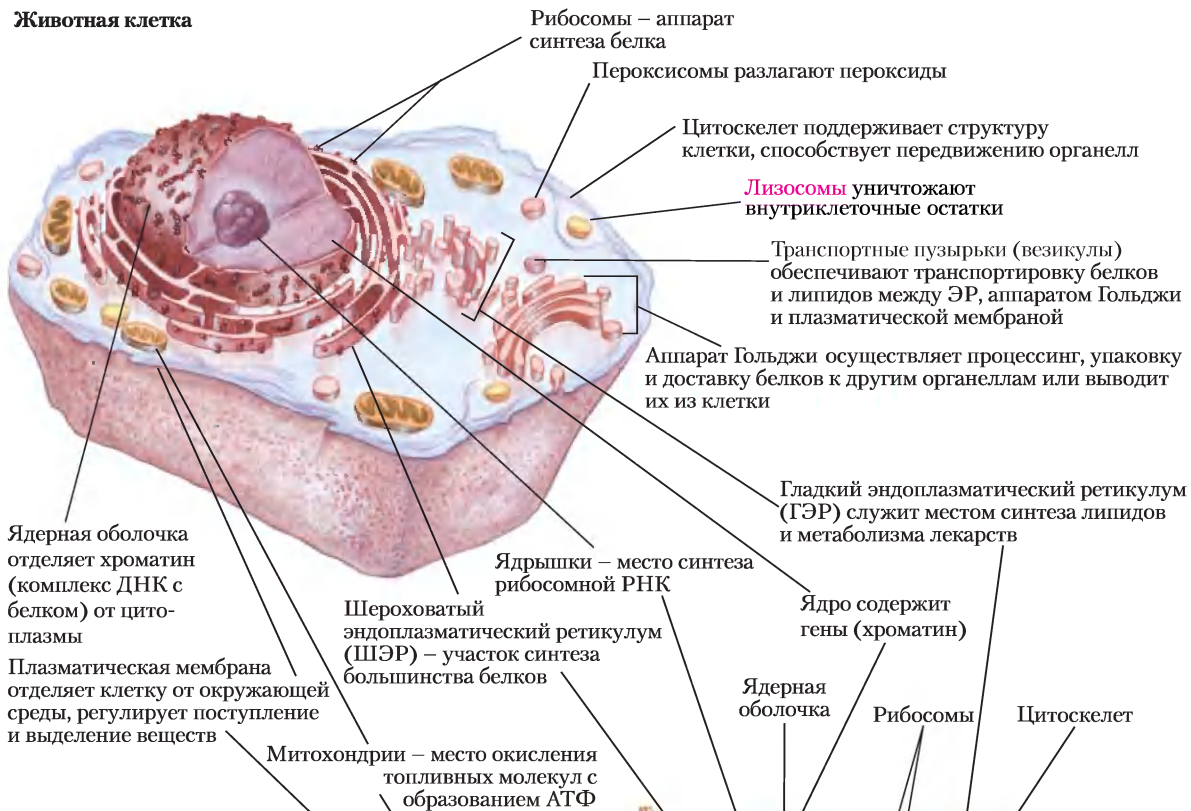


Рис. 1-6. Общие структурные элементы бактериальных клеток. В связи с различным строением клеточной оболочки некоторые зубактерии (грамположительные бактерии) удерживают краситель при окрашивании по Граму, а некоторые — нет (грамотрицательные бактерии). *E. coli* относится к грамотрицательным бактериям. Цианобактерии представляют собой зубактерии с особым строением внутренней мембраны, в которой локализованы фотосинтетические пигменты. Клеточные оболочки архей и грамположительных зубактерий под электронным микроскопом выглядят сходным образом, однако строение их мембранных липидов и полисахаридов заметно различается (см. рис. 10-12).

около 1000 органических веществ с молекулярной массой менее 1000 (метаболиты и кофакторы). В нуклеоиде расположена единственная кольцевая молекула ДНК, а в цитоплазме, как и у многих других бактерий, встречается одна или несколько более мелких кольцевых молекул ДНК,

называемых **плазмидами**. В природных условиях некоторые плазмиды обеспечивают устойчивость бактерий к различным находящимся в окружающей среде токсинам и антибиотикам. В лабораторных условиях эти молекулы ДНК необычайно удобны для осуществления экспериментальных

Животная клетка



Ядерная оболочка отделяет хроматин (комплекс ДНК с белком) от цитоплазмы
 Плазматическая мембрана отделяет клетку от окружающей среды, регулирует поступление и выделение веществ

Митохондрии – место окисления топливных молекул с образованием АТФ

Шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР) – участок синтеза большинства белков

Ядрышки – место синтеза рибосомной РНК

Гладкий эндоплазматический ретикулум (ГЭР) служит местом синтеза липидов и метаболизма лекарств

Ядро содержит гены (хроматин)

Ядерная оболочка

Рибосомы

Цитоскелет

Аппарат Гольджи

Хлоропласты собирают солнечный свет, образуют АТФ и углеводы

Гранулы крахмала служат местом хранения углеводов, образовавшихся в результате фотосинтеза

Тилакоиды – участки светозависимого синтеза АТФ

Клеточная стенка обеспечивает жесткость и форму клетки, защищает ее от осмотического шока

Вакуоли – место разложения и переработки макромолекул, а также место хранения метаболитов

Плазмодесма обеспечивает контакт между двумя растительными клетками

Клеточная стенка соседней клетки

Глиоксисома – место хранения ферментов глиоксилатного цикла

Растительная клетка

Рис. 1-7. Строение эукариотической клетки. Схематически изображены клетки двух основных типов: *вверху* — животная клетка, *внизу* — растительная клетка. Клетки растений обычно имеют диаметр от 10 до 100 мкм, а животные клетки — от 5 до 30 мкм. Структуры, выделенные красным цветом, присутствуют только в животных или только в растительных клетках. В клетках эукариотических микроорганизмов (например, протистов и грибов) имеются такие же структуры, как в клетках растений и животных, а кроме того, во многих из них также есть специализированные органеллы, которые здесь не изображены.

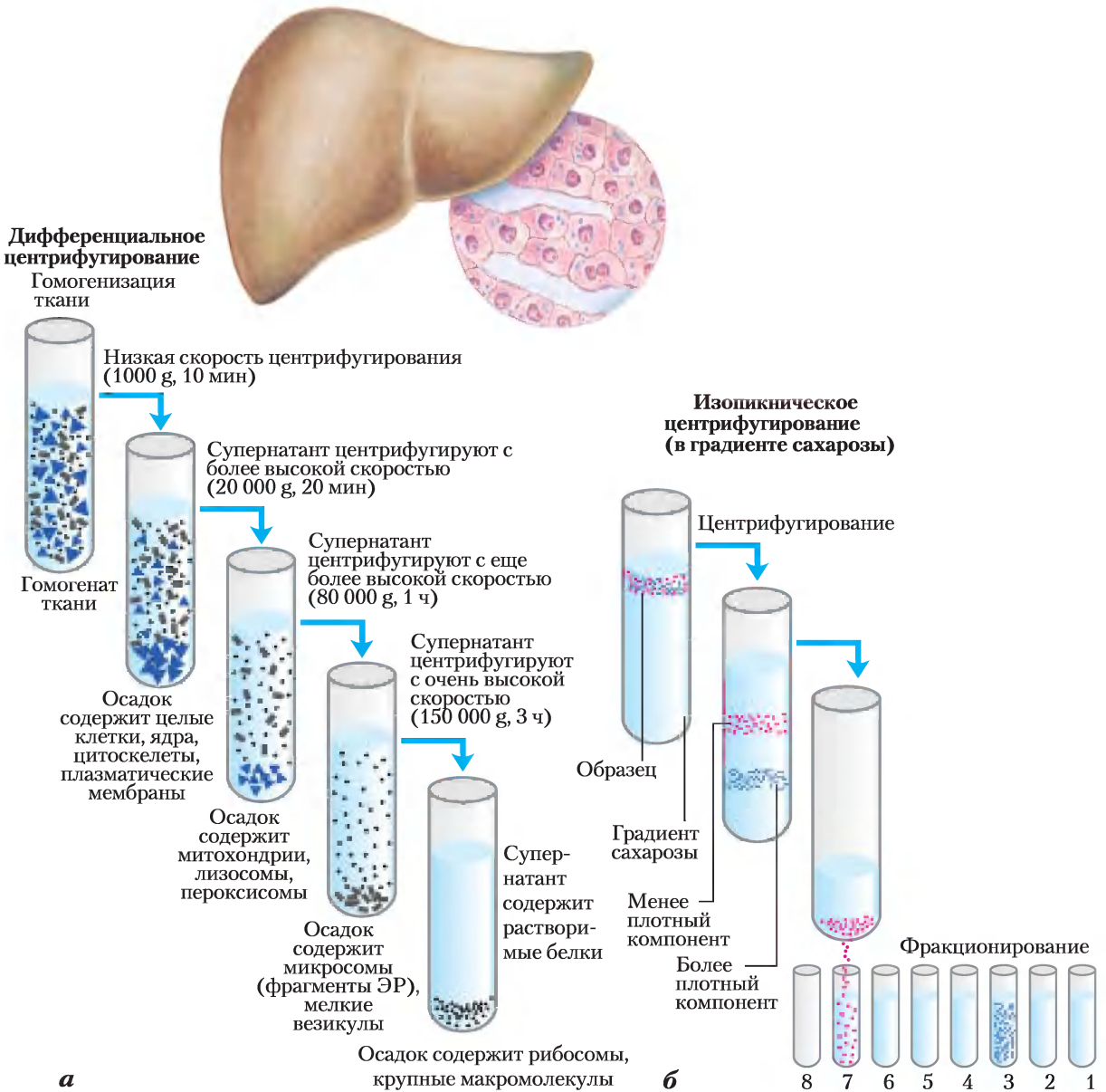


Рис. 1-8. Разделение субклеточных структур ткани. Для получения внутриклеточных органелл ткань, например, печени сначала подвергают механической гомогенизации для разрушения клеток и диспергирования их содержимого в буфере. Раствор сахарозы обеспечивает практически такое же осмотическое давление, какое существует внутри клеточных органелл, что препятствует проникновению в органеллы воды, их разбуханию и разрушению. а) Крупные и мелкие частицы в суспензии можно разделить центрифугированием с разными скоростями. б) Частицы различной плотности можно разделить изопикническим центрифугированием. Для этого центрифужные пробирки заполняют раствором, плотность которого возрастает сверху вниз. Для получения градиента плотности готовят, например, растворы с разной концентрацией сахарозы. Затем смесь органелл помещают в верхнюю часть пробирки и центрифугируют с высокой скоростью. При этом органеллы осаждаются в градиенте до того уровня, плотность которого точно соответствует их собственной. После центрифугирования каждый слой можно отобрать из пробирки отдельно.

манипуляций и очень широко используются молекулярными генетиками.

Большинство бактерий (включая *E. coli*) существуют в виде индивидуальных клеток, но некоторые виды бактерий (например, миксобактерии) демонстрируют простейшее «социальное поведение», образуя многоклеточные агрегаты.

Эукариотические клетки содержат разнообразные мембраносвязанные органеллы, которые можно выделить и исследовать

Типичные эукариотические клетки (рис. 1-7) во много раз превышают по размеру бактериальные и обычно имеют диаметр от 5 до 100 мкм, а их объем в тысячи или миллионы раз больше объема бактериальных клеток. Отличительной особенностью эукариот является наличие ядра и многочисленных связанных с мембраной органелл со специфическими функциями: митохондрий, эндоплазматического ретикулума, комплекса Гольджи, пероксисом и лизосом. В растительных клетках, кроме того, содержатся вакуоли и хлоропласты (рис. 1-7). В цитоплазме многих клеток присутствуют гранулы или капельки, содержащие запасные питательные вещества, такие как крахмал и жиры.

Значительный вклад в развитие биохимии внесли работы Альбера Клода, Кристиана де Дюва и Джорджа Паладе, посвященные методам разделения клеточных органелл — важного этапа в выделении и изучении функций биомолекул и более крупных клеточных структур. При обычной процедуре фракционирования (рис. 1-8) клетки или ткани, находящиеся в растворе, гомогенизируют в мягких условиях. При этом происходит разрыв плазматической мембраны, но большинство клеточных органелл сохраняют свою целостность. Затем гомогенат центрифугируют. Ядра, митохондрии и лизосомы различаются по размеру и соответственно по скорости седиментации. У них разная удельная плотность и при центрифугировании в градиенте плотности они оказываются в разных фракциях.

Дифференциальное центрифугирование приводит к грубому фракционированию содержимого цитоплазмы. Далее каждую фракцию можно разделить изопикническим* центрифугированием.

При этом органеллы с разной плавучей плотностью (результат различного соотношения в них белков и липидов) разделяются центрифугированием в слое растворителя с градиентом плотности. Осторожно отбирая каждую фракцию градиента в центрифужной пробирке, можно рассмотреть в микроскоп все органеллы и приступить к дальнейшему изучению очищенной фракции. Таким образом удалось установить, например, что лизосомы содержат гидролитические ферменты, митохондрии — окислительные ферменты, а хлоропласты — фотосинтетические пигменты. Выделение органеллы, содержащей определенный фермент, часто является первой стадией очистки данного фермента.

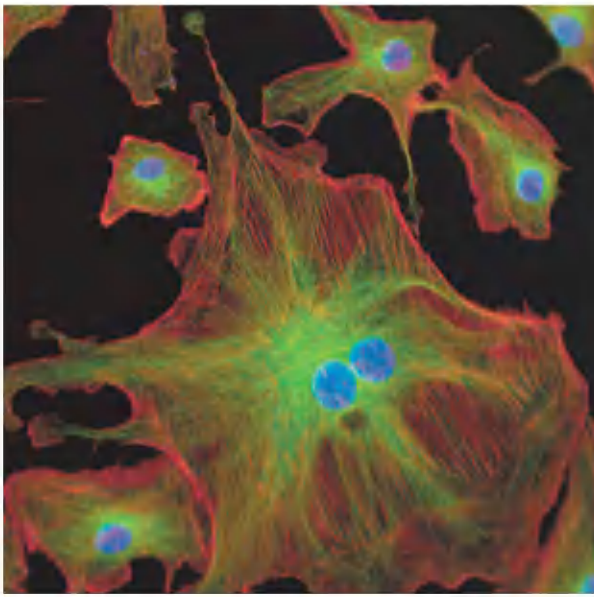
Цитоплазма имеет цитоскелет и обладает динамическими свойствами

С помощью флуоресцентной микроскопии можно различить несколько типов белковых филаментов, пересекающих крест-накрест эукариотическую клетку и образующих трехмерную сеть, называемую **цитоскелетом**. Существуют три основных типа цитоплазматических фибрилл (нитей) — актиновые филаменты, микротрубочки и промежуточные филаменты (рис. 1-9); они различаются по толщине (от 6 до 22 нм), строению и специфическим функциям. Все филаменты служат для организации и структурирования цитоплазмы и придают форму клетке. Актиновые филаменты и микротрубочки также способствуют передвижению органелл и целых клеток.

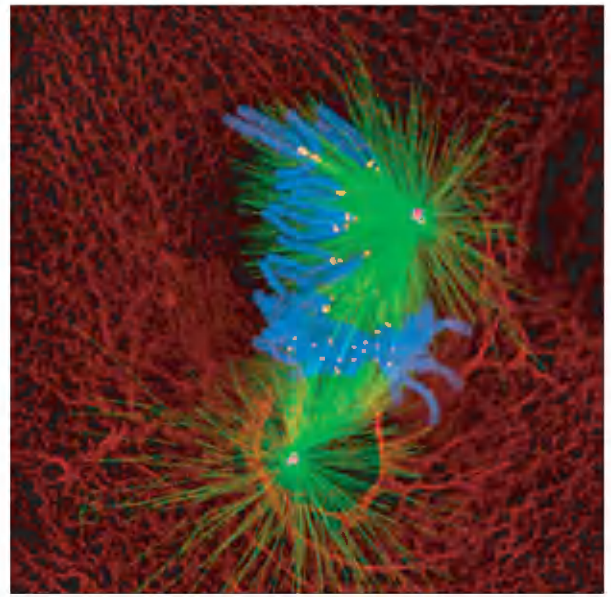
Все фибриллы цитоскелета, независимо от типа, построены из простых белковых молекул, которые, связываясь друг с другом нековалентно, образуют тяжи определенной толщины. Эти филаменты не являются постоянными структурами: они непрерывно диссоциируют на составляющие их единицы и собираются вновь. Их положение в клетке также не фиксировано строго, а может значительно изменяться при митозе, цитокинезе, амебоидном движении или при изменениях формы клетки. Разборка, сборка и локализация всех типов филаментов регулируются другими белками, которые необходимы для связывания филаментов или перемещения вдоль них цитоплазматических органелл.

Описанная выше ситуация наблюдается в эукариотической клетке с сетчатой структурой нитей и сложной организацией мембраносвязан-

* Изопикнический — имеющий ту же плотность.



а



б

Рис. 1-9. Три типа волокон цитоскелета: актиновые волокна, микротрубочки и промежуточные волокна. Клеточные структуры можно пометить с помощью антител (узнающих определенные белки) с флуоресцентной меткой, присоединенной ковалентной связью. С помощью флуоресцентного микроскопа в обработанных таким образом клетках можно увидеть соответствующие структуры. *а)* Клетки эндотелия легочной артерии быка. В красный цвет окрашены пучки актиновых волокон, называемые стрессовыми волокнами; в зеленый цвет — выходящие из центра клетки микротрубочки; в синий — хромосомы внутри ядра. *б)* Клетки легких тритона в митозе. Микротрубочки (зеленый цвет), прикрепленные к кинетохорам (желтый цвет) на конденсированных хромосомах (синий цвет), растягивают хромосомы к противоположным полюсам клетки (центросомы; малиновый цвет). Промежуточные волокна, построенные из кератина (красный цвет), служат для поддержания структуры клетки.

ных *компарментов* (рис. 1-7). Филаменты разбираются и вновь собираются в каком-то другом участке клетки. Окруженные мембраной частицы отпочковываются от одной органеллы и сливаются с другой. Органеллы перемещаются в цитоплазме вдоль белковых филаментов, а энергию для этих передвижений обеспечивают моторные белки. **Внутренние мембраны** разделяют отдельные метаболические процессы и служат поверхностями, на которых протекают некоторые ферментативные реакции. Транспортные механизмы **эндо- и экзоцитоза**, способствующие проникновению веществ соответственно в клетку и из нее, связаны со слиянием и раскрытием мембран. Эти процессы обеспечивают обмен между цитоплазмой и окружающей средой и позволяют осуществлять секрецию произведенных в клетке продуктов и захват внеклеточных веществ.

Подобная организация цитоплазмы сложна, но далеко не хаотична. Движение и локализация органелл и элементов цитоскелета находятся под строгим контролем. На определенных этапах жизни эукариотической клетки происходят серьезные, точно спланированные перестройки, такие как митоз. Взаимодействия между цитоскелетом и органеллами обратимы и имеют нековалентную природу; их регуляцию осуществляют различные внутри- и внеклеточные сигналы.

В клетках существуют надмолекулярные структуры

Макромолекулы и их мономерные звенья сильно различаются по размерам (**рис. 1-10**). Молекула аланина имеет длину менее 0,5 нм. Переносящая кислород молекула гемоглобина в эритроцитах со-

Некоторые аминокислоты

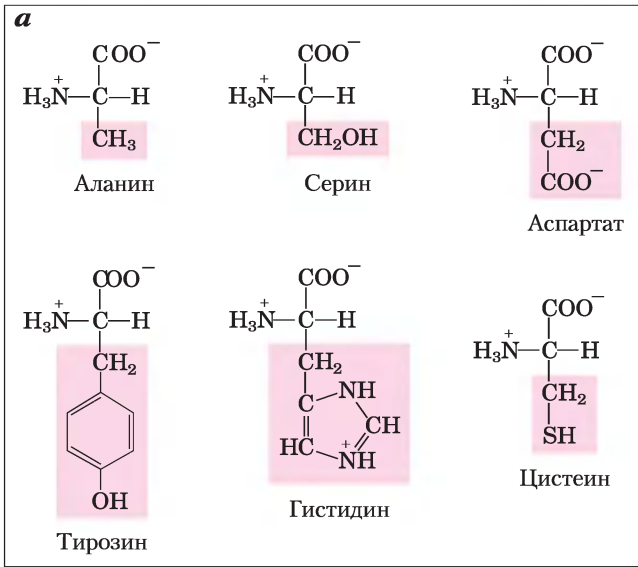
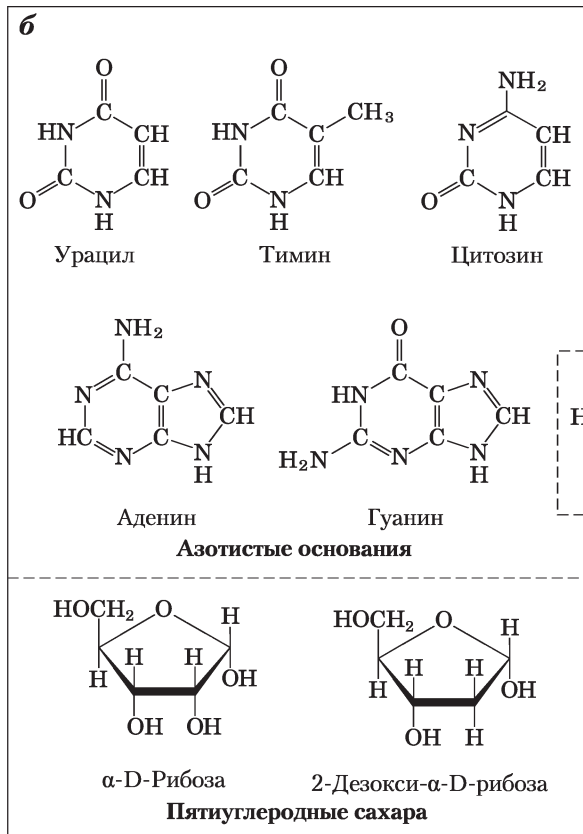
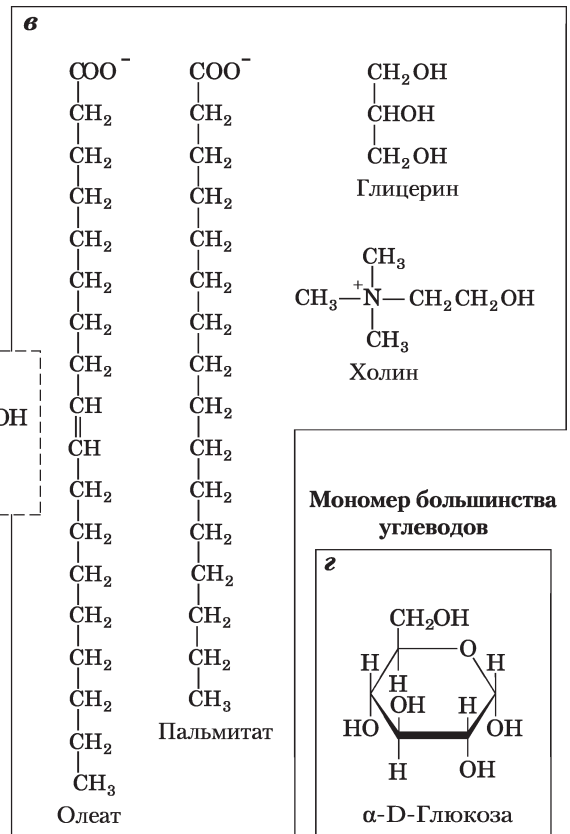


Рис. 1-10. Органические молекулы, из которых построена основная часть клеточного вещества: «биохимический алфавит». а) Шесть из 20 аминокислот, из которых состоят все белки (боковая цепь выделена розовым цветом); б) пять азотистых оснований, два пятиуглеродных сахара и остаток фосфорной кислоты, из которых построены все нуклеиновые кислоты; в) пять компонентов мембранных липидов; г) D-глюкоза — мономер большинства углеводов. Заметьте, что остаток фосфорной кислоты входит в состав как нуклеиновых кислот, так и мембранных липидов.

Компоненты нуклеиновых кислот



Некоторые компоненты липидов



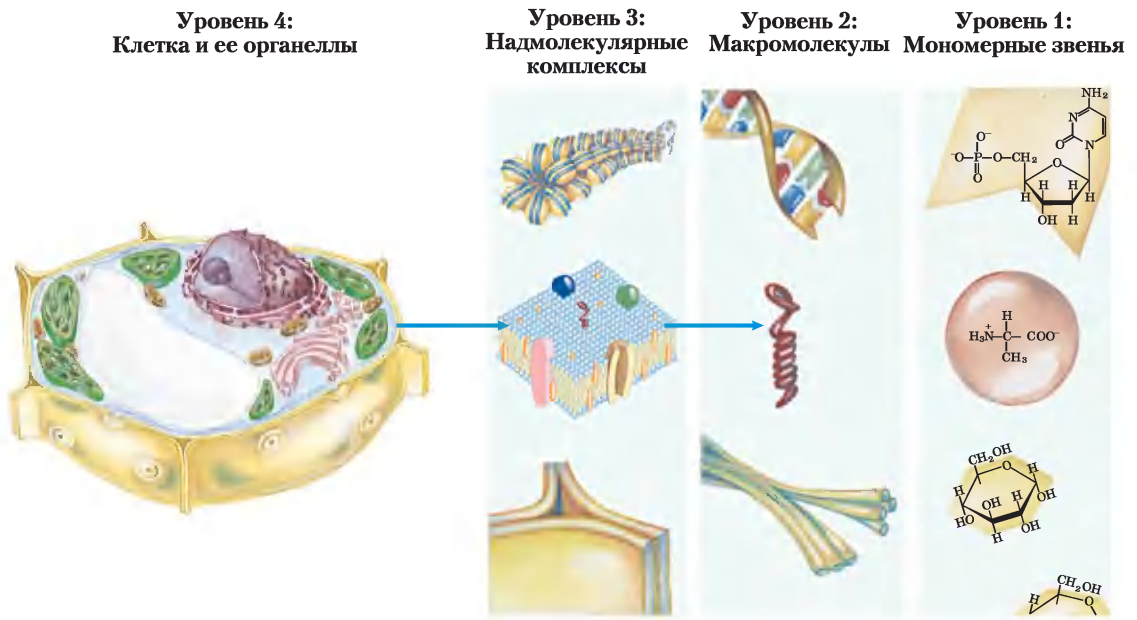


Рис. 1-11. Структурная иерархия в молекулярной организации клетки. В растительной клетке ядро содержит несколько типов надмолекулярных комплексов, включая хромосомы. Хромосомы состоят из макромолекул ДНК и множества различных белков. Каждый тип макромолекул построен из простых мономерных звеньев, например ДНК состоит из нуклеотидов (дезоксирибонуклеотидов).

стоит приблизительно из 600 аминокислотных звеньев, организованных в четыре длинные цепи, сложенные в глобулы; нативный гемоглобин достигает в диаметре 5,5 нм. Белки, в свою очередь, гораздо мельче рибосом (диаметр последних около 20 нм), а те значительно уступают по размерам таким органеллам, как митохондрии (диаметр митохондрий около 1000 нм). Существует колоссальная разница между простыми биомолекулами и теми клеточными структурами, которые можно наблюдать в световой микроскоп. Иерархия в структурной организации клетки изображена на [рис. 1-11](#).

Мономерные звенья белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов связаны ковалентными связями. В надмолекулярных комплексах молекулы удерживаются вместе гораздо более слабыми нековалентными взаимодействиями, среди которых выделяют водородные связи (между полярными группами), ионные (между заряженными группами), гидрофобные (между неполярными группами в водных средах) и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, причем все нековалентные взаимодействия характеризуются гораздо меньшей энергией, чем ковалентная связь. Природа этих не-

ковалентных взаимодействий обсуждается в гл. 2. Макромолекулы в надмолекулярных структурах удерживаются большим числом слабых взаимодействий, обеспечивающих уникальную структуру этих комплексов.

В исследованиях *in vitro* можно не заметить важных взаимодействий между молекулами

Одним из подходов к исследованию биологических процессов является изучение очищенных молекул *in vitro* («в пробирке») при отсутствии других «лишних» молекул, находящихся в интактной клетке (т. е. *in vivo* — «в живом организме»). Такой подход весьма полезен, однако не следует забывать, что содержимое клетки очень сильно отличается от содержимого пробирки. «Лишние» компоненты, удаленные при очистке, могут играть важнейшую роль для биологического действия или для регуляции выделенной молекулы. Например, изучение чистых ферментов *in vitro* обычно проводят при очень низких концентрациях ферментов в тщательно перемешиваемых водных растворах. В клетках ферменты раство-

рены или суспендированы в желеобразном цитозоле вместе с тысячами других белков, некоторые из которых связывают данный фермент и влияют на его активность. Многие ферменты входят в полиферментные комплексы, в которых реагирующие вещества «передаются» от одних ферментов к другим, вовсе не выходя в окружающую среду. В желеобразном цитозоле диффузия затруднена, поэтому его состав в разных участках клетки может быть различным. Короче говоря, исследуемая молекула может вести себя в пробирке совсем не так, как в клетке. Основной задачей биохимии является изучение влияния клеточной организации и макромолекулярных комплексов на функционирование отдельных ферментов и других биологических молекул для понимания законов их функционирования как *in vivo*, так и *in vitro*.

Краткое содержание раздела 1.1. ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ КЛЕТКИ

- Все клетки ограничены плазматической мембраной, имеют цитозоль, в котором растворены метаболиты, коферменты, неорганические ионы и ферменты, а также содержат набор генов, заключенных в нуклеоид (бактерии и археи) или ядро (эукариоты).
- Фототрофы для своей жизнедеятельности используют солнечный свет, хемотрофы окисляют топливные молекулы, передавая электроны на акцепторы электронов: неорганические вещества, органические вещества или молекулярный кислород.
- Бактериальные клетки и клетки архей имеют цитозоль, нуклеоид и плазмиды. Эукариотические клетки содержат ядро и разделены на множество компартментов, где в различных органеллах протекают специфические процессы; органеллы можно выделить и изучать отдельно.
- Белки цитоскелета собраны в длинные нити (филаменты), придающие клетке прочность, определяющие ее форму и служащие в качестве направляющих путей для движения клеточных органелл.
- Надмолекулярные комплексы удерживаются за счет нековалентных взаимодействий и

имеют иерархическую структуру; некоторые комплексы видны в световой микроскоп. При выделении отдельных молекул из этих комплексов для исследований *in vitro* могут быть упущены некоторые важные закономерности жизнедеятельности клетки.

1.2. Химические основы биохимии

Биохимия объясняет биологические принципы в химических терминах. В конце XVIII в. химики пришли к выводу, что составы живой и неживой материи принципиальным образом различаются. Антуан Лавуазье (1743–1794) отмечал относительную химическую простоту «минерального мира» в отличие от сложности «мира растений и животных», который, как он знал, был построен из соединений, богатых такими элементами, как углерод, кислород, азот и фосфор.

В первой половине XX в. были проведены исследования биохимического процесса разложения глюкозы в дрожжах и в мышечных клетках животных. Удивительно, но химизм процессов в этих двух, казалось бы, таких разных типах клеток оказался схожим: разложение глюкозы в обоих случаях проходило с образованием десяти одних и тех же промежуточных продуктов и при участии десяти тех же самых ферментов. Последующее изучение многих других биохимических процессов во множестве различных организмов подтвердило общность этого наблюдения, что было метко сформулировано в 1954 г. Жаком Моно: «Что верно для *E. coli*, то верно и для слона». Установившаяся сегодня точка зрения об общности происхождения всех организмов от одного эволюционного предшественника частично основана на этой повсеместно наблюдаемой универсальности химических превращений и промежуточных продуктов, которую часто называют «биохимическим единством».

Для живых организмов важными являются лишь менее 30 из более чем 90 существующих в природе химических элементов. Большинство элементов живой материи имеют небольшой атомный номер: лишь пять элементов имеют атомные номера выше 34 (селен) (рис. 1-12). В клетках преобладают четыре элемента: водород, кислород, азот и углерод; в большинстве клеток на их долю приходится более 99% мас-

1 H																	2 He	
3 Li	4 Be	<div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> Основные элементы </div>										5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne	
11 Na	12 Mg	<div style="display: flex; align-items: center; gap: 10px;"> Микроэлементы </div>										13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar	
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr	
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe	
55 Cs	56 Ba	Лантаноиды		72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra	Актиноиды																

Рис. 1-12. Элементы, необходимые для жизни и здоровья животных. Основные элементы (отмечены оранжевым цветом) входят в состав всех клеток и тканей; ежедневная потребность в них исчисляется в граммах. Потребность в следовых элементах (отмечены желтым цветом) гораздо ниже: человеку требуется всего несколько миллиграммов Fe, Cu и Zn в сутки, а остальных элементов еще меньше. Потребность в элементах у растений и микроорганизмов похожа, однако способы получения этих элементов различаются.

сы. Эти легкие элементы способны образовать соответственно одну, две, три и четыре прочные связи, причем в соответствии с общим правилом чем легче элемент, тем более прочные связи он образует. Микроэлементы (рис. 1-12) составляют очень малую долю массы человеческого тела, однако они играют важную роль, поскольку обычно необходимы для функционирования специфических белков, в том числе и многих ферментов. Например, способность молекулы гемоглобина переносить кислород зависит от четырех ионов железа, которые составляют лишь 0,3% массы этой молекулы.

Биомолекулы представляют собой органические соединения, содержащие различные функциональные группы

Химические свойства живых организмов в первую очередь связаны с тем, что в их состав входит углерод, на долю которого приходится более половины сухой массы клеток. Углерод способен образовывать одинарные связи с атомами водорода, одинарные и кратные (двойные и тройные) между атомами в углеродной цепи, а также связи с атомами кислорода (одинарные и двойные), азота (одинарные, двойные и тройные) и с дру-

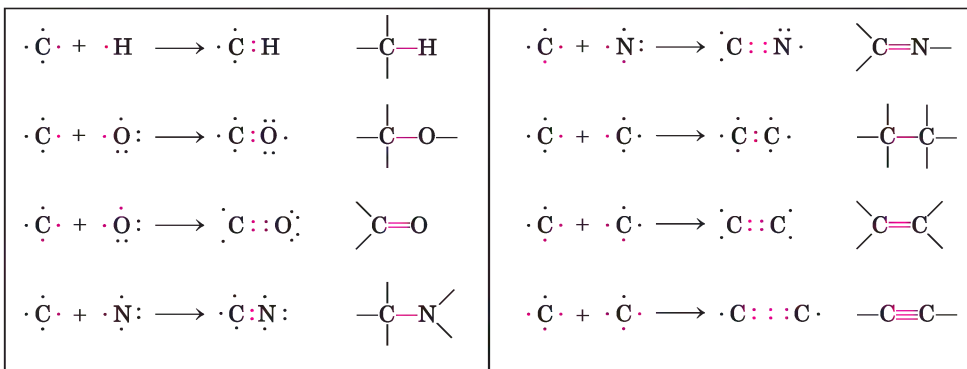


Рис. 1-13. Многообразие углеродных связей. Углерод может образовывать одинарные, двойные и тройные ковалентные связи (все показано красным цветом), в том числе и с другими атомами углерода. Тройные связи в биомолекулах встречаются редко.

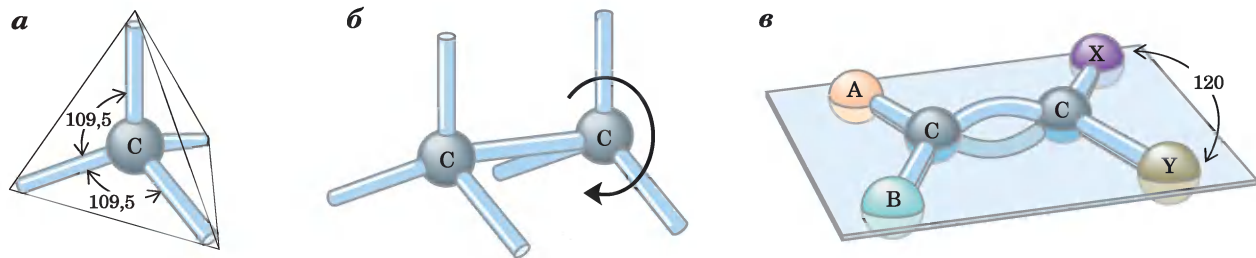


Рис. 1-14. Геометрия углерод-углеродных связей. а) Четыре одинарные связи, которые образует атом углерода, направлены в пространстве к вершинам правильного тетраэдра; б) вокруг одинарных связей углерод-углерод возможна полная свобода вращения, как это показано на примере молекулы этана ($\text{CH}_3\text{-CH}_3$); в) двойная углерод-углеродная связь короче и не допускает свободного вращения. Оба атома углерода, образующие двойную связь, а также атомы А, В, X и Y лежат в одной плоскости.

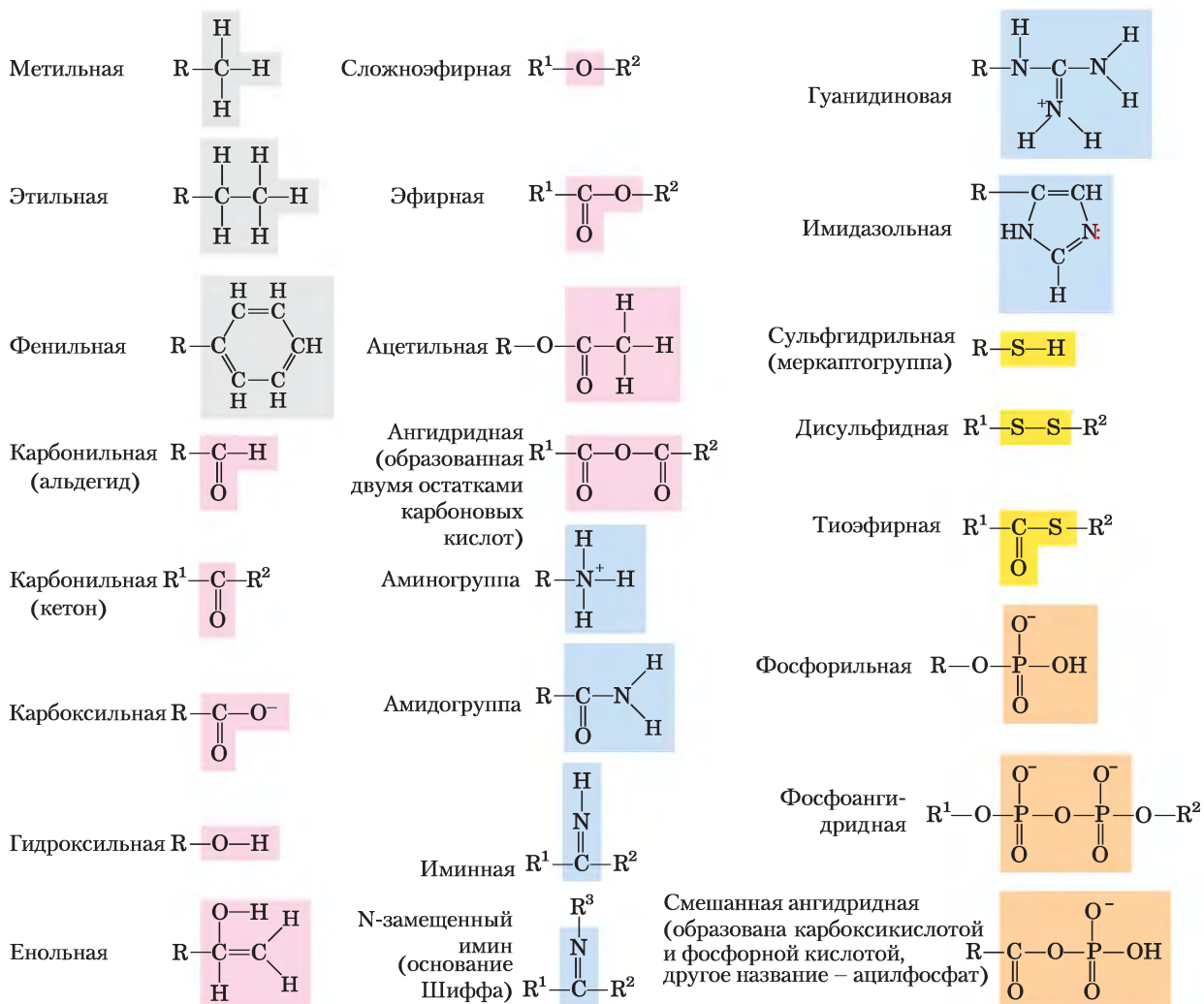


Рис. 1-15. Некоторые характерные функциональные группы биомолекул. На данном рисунке и далее в книге R — любой заместитель (функциональная группа). Это может быть просто атом водорода, но чаще какой-либо углеродсодержащий радикал. Если в молекуле несколько заместителей, их обозначают как R^1 , R^2 и т. д.

гими элементами (рис. 1-13). Для биологии важное значение имеет способность атомов углерода образовывать стабильную одинарную связь с четырьмя другими атомами углерода. Кроме того, два атома углерода могут «обобществить» две или три пары электронов, в результате чего возникает двойная или тройная связь.

Четыре одинарные ковалентные связи, образуемые атомом углерода, направлены в пространстве к вершинам правильного тетраэдра, причем угол между двумя любыми связями составляет около $109,5^\circ$ (рис. 1-14), а длина связей равна примерно 0,154 нм. Все атомы или группы в таких тетраэдрических молекулах могут свободно вращаться вокруг одинарных связей, за исключением тех случаев, когда к двум соседним атомам углерода присоединены очень большие или сильно заряженные группы атомов. Двойная углерод-углеродная связь короче одинарной (около 0,134 нм) и вокруг нее невозможно вращение.

Связанные ковалентной связью атомы углерода в составе биомолекул могут образовывать линейные и разветвленные цепи и циклические

структуры. Возможно, что в процессе возникновения и эволюции живых организмов способность углерода образовывать разные типы углерод-углеродных связей, а также связей с другими элементами стала решающим фактором, определившим выбор именно соединений углерода в качестве основного строительного материала клеток. Никакой другой химический элемент не способен создавать молекулы с таким разнообразием размеров, форм и функциональных групп.

Большинство биомолекул можно рассматривать в качестве производных углеводородов, в которых атомы водорода заменены функциональными группами, которые придают молекуле различные химические свойства. При этом образуются органические соединения различных классов. Спирты содержат одну или несколько гидроксильных групп; амины — аминогруппы; альдегиды и кетоны — карбонильные группы; карбоновые кислоты — карбоксильные группы (рис. 1-15). Многие биомолекулы полифункциональны, т. е. содержат две или несколько разных функциональных групп (рис. 1-16), каждая из

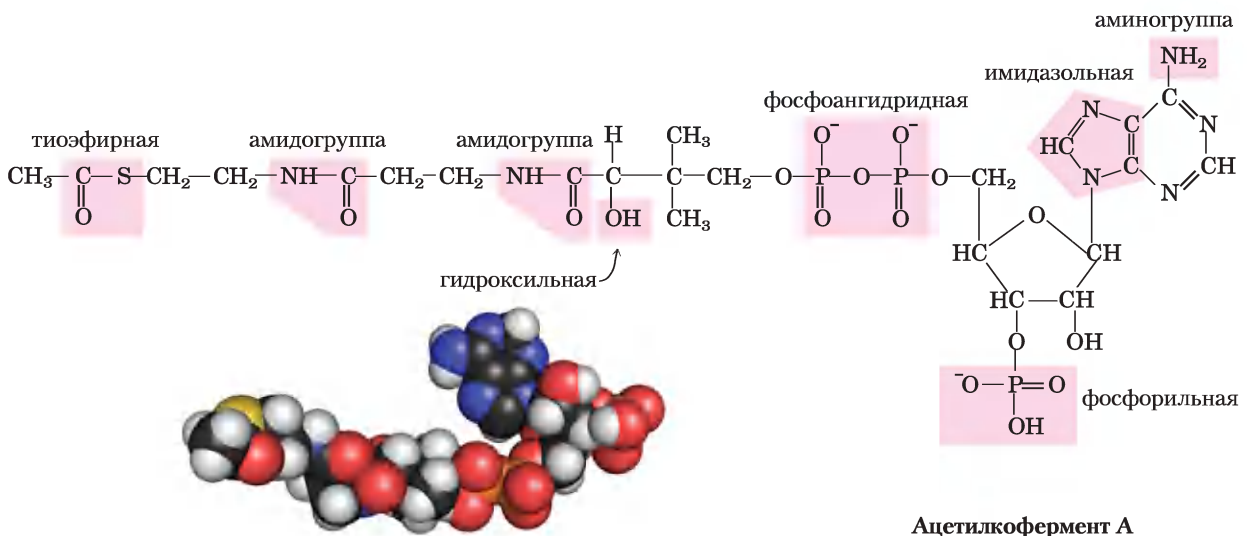


Рис. 1-16. Некоторые характерные функциональные группы одной биомолекулы. Ацетилкофермент А (ацетил-СоА) является переносчиком ацетильных групп в некоторых ферментативных реакциях. На структурной формуле молекулы цветом показаны функциональные группы. Как мы увидим в гл. 2, некоторые из этих функциональных групп могут существовать в протонированной и непротонированной формах в зависимости от pH среды. В пространственной модели атомы N изображены синим цветом, атомы С черные, атомы Р оранжевые, атомы О красные, а атомы Н белые. Слева желтым цветом обозначен атом серы в тиоэфирной связи между ацетильным остатком и коферментом А.

которых имеет свои химические характеристики и участвует в специфических реакциях. Химическая «индивидуальность» соединения определяется химией его функциональных групп и их расположением в трехмерном пространстве.

Клетки содержат универсальный набор небольших молекул

В водной фазе (цитозоле) каждой клетки растворено около тысячи различных небольших органических молекул с молекулярной массой от ~100 до ~500 (в дополнении 1-1 объясняются различные способы выражения молекулярных масс). Ключевые метаболиты основных метаболических путей, сохранившихся в ходе эволюции, обнаруживаются практически во всех клетках. Этот набор молекул включает основные аминокислоты, нуклеотиды, сахара и их фосфорилированные производные, а также ряд моно-, ди- и трикарбоновых кислот. Все эти молекулы полярны или заряжены, растворимы в воде и присутствуют в клетке в микромолярных или миллимолярных концентрациях. Они удерживаются внутри клетки, поскольку не могут самостоятельно проникнуть сквозь плазматическую мембрану. У эукариот транспорт молекул в клетку и из нее, а также между разными компартментами клетки обеспечивают специфические мембранные транспортные структуры. Единый набор одних и тех же веществ в клетках живых организмов отражает универсальность метабо-

лических механизмов и их эволюционный консерватизм от самых первых клеток.

Однако некоторые небольшие биологические молекулы встречаются только в определенных типах клеток или организмов. Например, сосудистые растения кроме обычного набора молекул содержат небольшие молекулы — **вторичные метаболиты**, которые играют специфическую роль в жизни растений. К этим метаболитам относятся соединения, придающие растениям характерные запахи, и такие вещества, как морфин, хинин, никотин и кофеин, которые оказывают сильное физиологическое действие на организм человека, а растения используют их совсем для других целей. Полный набор небольших молекул в конкретной клетке называют «пулом метаболитов», или **«метаболомом»** по аналогии с термином «геном» (более подробно см. в разд. 1.5).

Основными компонентами клеток являются макромолекулы

Многие биологические молекулы представляют собой **макромолекулы**, т. е. полимеры с молекулярной массой свыше 5000, построенные из простых предшественников. Короткие полимерные молекулы называют олигомерами (от греч. *oligos* — несколько). Белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды — все это макромолекулы, состоящие из мономеров с молекулярной массой 500 и ниже. На синтез макромолекул клетка расходует основной

Дополнение 1–1 Абсолютная и относительная молекулярная масса. Единицы измерения

При указании молекулярной массы используют две эквивалентных размерности. Оба способа можно встретить в этой книге. Во-первых, *относительная молекулярная масса* M (или M_r), которая определяется как отношение массы молекулы к одной двенадцатой массы атома углерода-12 (^{12}C). Поскольку M определена как отношение, это величина безразмерная. Во-вторых, *абсолютная молекулярная масса*, m . Это просто-напросто масса одной молекулы, т. е. массы одного моля вещества в граммах к числу Авогадро (числу молекул в 1 моль). Абсолютная молекулярная масса измеряется в дальтонах (Да). 1 Да = $1/12$ массы атома углерода-12. 1 кДа = 1000 Да, 1 МДа = 1 000 000 Да.

Пусть дано, что молекулярная масса в 1000 раз больше молекулярной массы воды. Правильная запись: $M = 18\,000$, $m = 18\,000$ Да = 18 кДа; неправильно: $M = 18\,000$ Да.

Кроме того, массы атомов или молекул выражают в атомных единицах массы (а. е. м. или а. е.). 1 а. е. м. определена как $1/12$ массы атома углерода-12. Поскольку экспериментально определенная масса атома ^{12}C составляет $1,9926 \cdot 10^{-23}$ г, 1 а. е. м. = $1,6606 \cdot 10^{-24}$ г. Атомные единицы массы принято использовать при отнесении пиков на масс-спектрах (см. доп. 3-2).

запас своей энергии. Далее макромолекулы могут собираться в надмолекулярные комплексы, формируя такие функциональные структуры, как рибосомы. В табл. 1-1 представлены основные классы биомолекул в клетках бактерии *E. coli*.

Белки, представляющие собой длинные полимеры, построенные из аминокислотных звеньев, составляют самую большую фракцию веществ клетки (после воды). Некоторые белки выполняют каталитическую функцию (ферменты), другие служат в качестве структурных элементов, рецепторов или переносчиков, участвующих в перемещении веществ в клетку и из нее. Белки, вероятно, наиболее многочисленны по своему разнообразию и функциям среди всех типов биомолекул. Все белки, функционирующие в данной клетке, называют **протеомом** клетки. **Нуклеиновые кислоты** (РНК и ДНК) представляют собой полимеры, построенные из нуклеотидов. С их помощью в клетке хранится и передается генетическая информация; кроме того, некоторые молекулы РНК выполняют структурные или каталитические функции в надмолекулярных комплексах. **Полисахариды** построены из остатков простых сахаров, таких как глюкоза; они выполняют три основные функции: запасают энергию в клетке, составляют жесткий каркас клеточной стенки (у растений и бактерий) и служат внеклеточными элементами узнавания со специфическими участками связывания определенных белков других клеток. Короткие полимерные сахара (олигосахариды), связанные с белками или липидами на клеточной поверхности, играют роль специфических сигнальных молекул. **Липи-**

ды (в основном жиры, сложные эфиры жирных кислот) содержат остатки нерастворимых в воде органических кислот с длинным углеводородным «хвостом» являются структурными компонентами мембран, запасными топливными веществами, пигментами или внутриклеточными сигнальными молекулами. Число мономерных звеньев в молекулах белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и липидов очень велико: молекулярные массы белков составляют от 5000 до миллиона, полисахаридов типа крахмала — до нескольких миллионов, нуклеиновых кислот — до нескольких миллиардов. Молекулы липидов имеют меньшие размеры (M от 750 до 1500), и их обычно не относят к макромолекулам. Однако многие молекулы липидов способны к образованию крупных надмолекулярных структур, связанных нековалентными связями. Клеточные мембраны построены из гигантских агрегатов липидных и белковых молекул.

Поскольку последовательность белков и нуклеиновых кислот несет в себе много информации, эти молекулы часто называют **информационными макромолекулами**. Как упоминалось выше, некоторые олигосахариды также служат в качестве информационных молекул.

Трехмерная структура характеризуется конфигурацией и конформацией

Принципиальное значение для функционирования биомолекул, безусловно, имеет ковалентная структура и наличие функциональных групп, однако не менее важно расположение атомов в пространстве, т. е. стереохимия молекулы. Углеродсодержащие вещества обычно существуют в виде двух или более **стереоизомеров**, у которых при одинаковом химическом составе атомы расположены в пространстве по-разному. В таком случае говорят о разных **конфигурациях**. Взаимодействия между биомолекулами неизбежно происходят стереоспецифически, т. е. требуют специфической конфигурации реагирующих молекул.

На **рис. 1-17** представлено три способа стереохимического изображения структур простых молекул. Перспективная модель однозначным образом отражает специфическую стереохимическую структуру молекулы, однако углы взаимного расположения связей и длина связей доходчивее изображаются с помощью шаростержневых

Таблица 1-1 Молекулярный состав клетки *E. coli*

	Процент от общей массы клетки	Примерное число типов молекул
Вода	70	1
Белки	15	3 000
Нуклеиновые кислоты		
ДНК	1	1–4
РНК	6	> 3 000
Полисахариды	3	10
Липиды	2	20
Мономерные молекулы и промежуточные соединения	2	500
Неорганические ионы	1	20

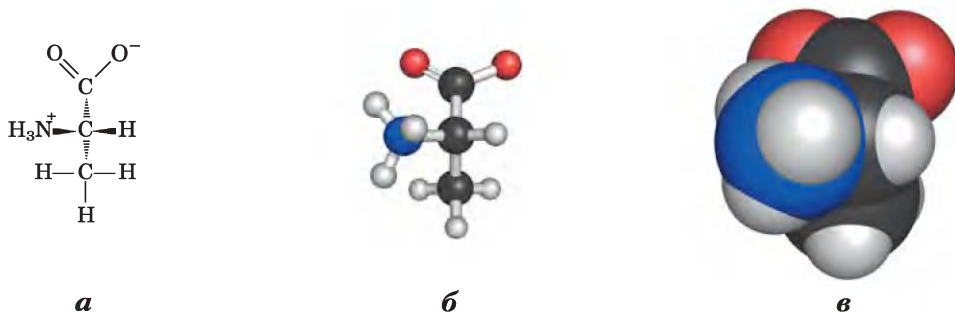


Рис. 1-17. Способы изображения молекул. Три модели показывают строение аминокислоты аланина. *а*) Перспективное изображение структурной формулы: темный клинышек (\blacktriangleright) обозначает связь, в которой расположенный на широком конце атом выходит из плоскости рисунка по направлению к читателю; заштрихованный клинышек (\blacksquare) обозначает связь, уходящую под плоскость рисунка; *б*) шаростержневая модель, на которой хорошо видны относительные длины связей и углы между ними; *в*) СРК-модель, в которой относительные размеры всех атомов соответствуют их ван-дер-ваальсовым радиусам. СРК-модель — модель Кори–Полинга–Колтуна (см. прим. на с. 35).

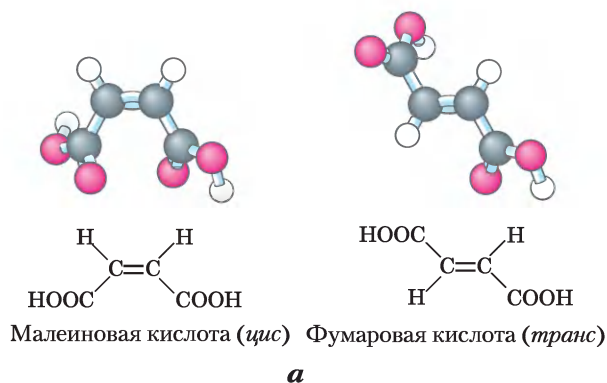
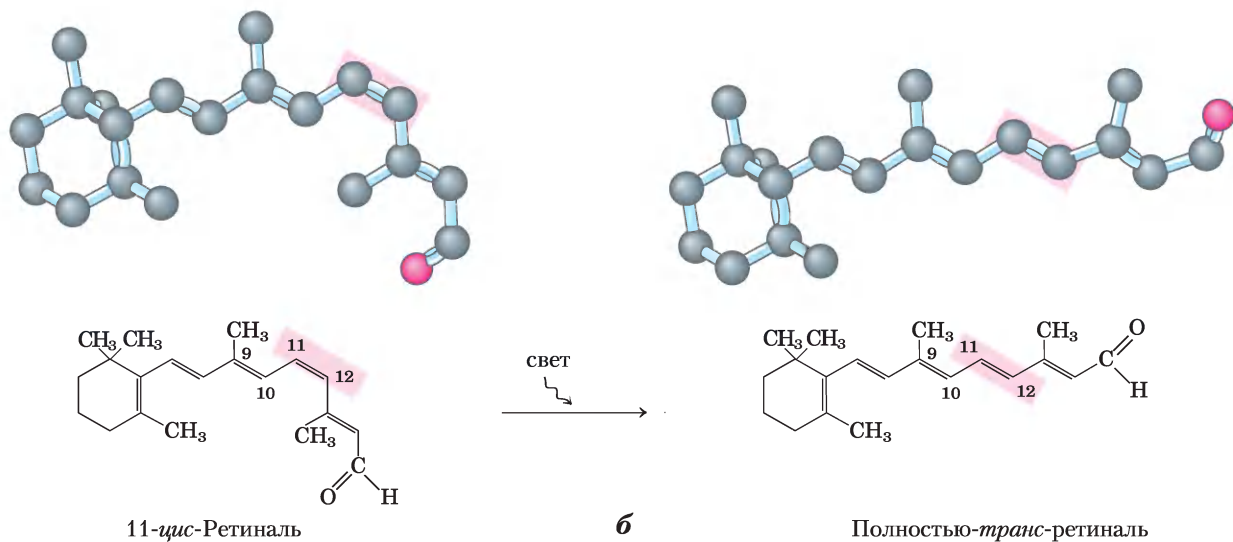


Рис. 1-18. Конфигурация геометрических изомеров.

а) Такие изомеры, как малеиновая и фумаровая кислоты, не могут превратиться друг в друга без разрыва ковалентных связей, что требует больших затрат энергии. *б*) На начальном этапе восприятия света в сетчатке позвоночных происходит поглощение видимого света 11-*цис*-ретиналем. Энергия поглощенного света (около 250 кДж/моль) способствует превращению 11-*цис*-ретиная в полностью-*транс*-ретиная, что запускает электрический импульс в клетках сетчатки. (В шаростержневых моделях ретиная атомы водорода не изображены.)



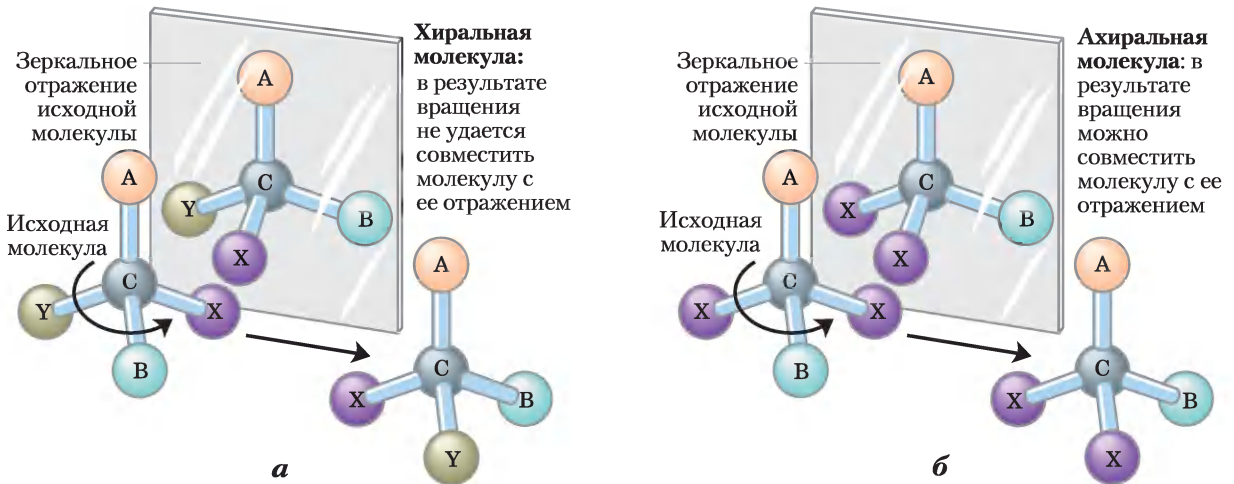


Рис. 1-19. Хиральные и ахиральные молекулы. а) Если атом углерода связан с четырьмя разными группами или атомами (A, B, X, Y), то последние могут располагаться двумя способами. При этом образуются две структуры, представляющие собой несовместимые зеркальные отражения друг друга (энантимеры). Такой асимметрический атом углерода называют хиральным атомом или хиральным центром. б) Когда атом углерода связан только с тремя разными группами или атомами (т. е. один и тот же заместитель встречается дважды), возможна лишь одна пространственная конфигурация. Такую молекулу называют симметрической или ахиральной. Эту молекулу можно совместить с ее зеркальным отражением: молекулу перед зеркалом (слева) нужно повернуть против часовой стрелки (ось вращения проходит сверху вниз по связи от А к С), и она совместится с изображением в зеркале.

моделей. В СРК-моделях* радиусы всех атомов пропорциональны их ван-дер-ваальсовым радиусам, а контур молекулы описывает занимаемое ею пространство (т. е. часть пространства, из которого исключены атомы, входящие в состав других молекул).

Конфигурация молекулы определяется наличием 1) двойной связи, вокруг которой невозможно свободное вращение, или 2) хирального центра, относительно которого заместители расположены определенным образом. Конфигурационные изомеры не могут превращаться друг в друга без разрыва одной или нескольких ковалентных связей. На **рис. 1-18** представлены модели малеиновой кислоты и ее изомера — фумаровой кислоты. Эти соединения — **геометрические изомеры**, или **цис-транс-изомеры**; они различаются расположением заместителей относительно

двойной связи (от лат. *cis* — на этой стороне, с одной стороны от двойной связи, *trans* — через, по разные стороны от двойной связи). Малеиновая кислота (в нейтральной среде цитоплазмы в виде малеата) — *цис*-изомер, а фумаровая (фумарат) — *транс*-изомер. Оба вещества хорошо изучены, имеют характерные свойства и могут быть разделены. Участок связывания одной из этих молекул (например, на молекуле фермента) не подходит для связывания другой, что объясняет различную биологическую роль этих соединений, хотя их структурная формула одинакова.

В другом типе стереоизомерии четыре различных заместителя при тетраэдрическом атоме углерода могут располагаться в пространстве двумя различными способами. В результате возникают две конфигурации (**рис. 1-19**) и два стереоизомера с похожими или даже идентичными химическими свойствами, но с индивидуальными физическими свойствами или биологической активностью. Атом углерода с четырьмя различными заместителями называют **асимметрическим**.

*По первым буквам имен Р. Кори (R. Cory), Л. Полинга (L. Poling) и У. Л. Колтуна (W. L. Koltun); другое название — spacefilling модели. — *Прим. перев.*

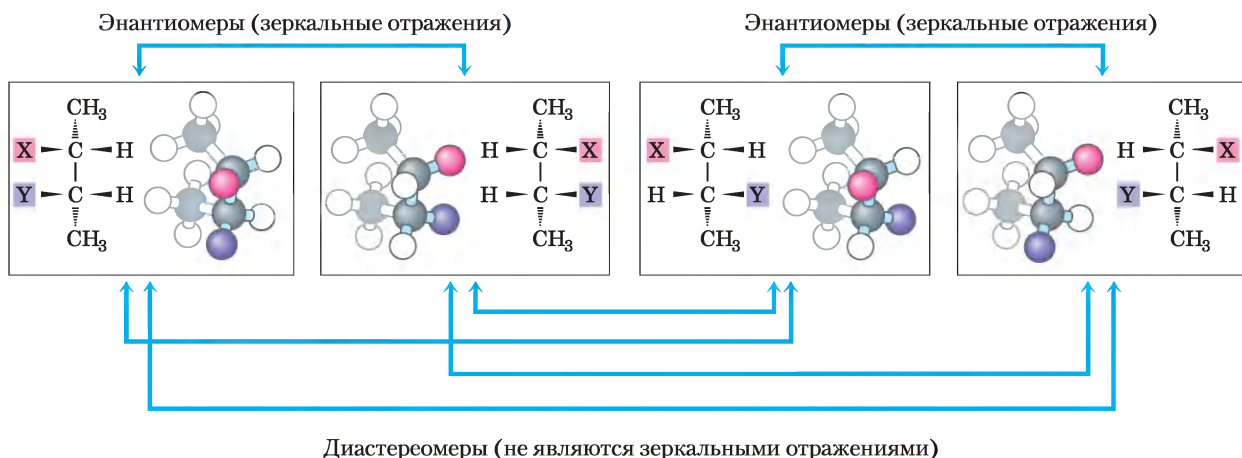
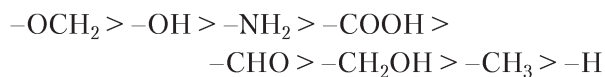


Рис. 1-20. Два типа стереоизомеров. Приведены изображения четырех различных 2,3-дизамещенных бутанов (число асимметричных атомов углерода $n = 2$, следовательно, возможно существование $2^n = 4$ стереоизомеров). Каждое вещество представлено в отдельной рамке с помощью перспективного изображения структурной формулы и шаростержневой модели, которая повернута различным образом, чтобы дать возможность увидеть все группы. Две пары стереоизомеров являются зеркальными отражениями друг друга, т. е. энантиомерами. Другие пары не зеркальные отражения, они диастереомеры.

Такой атом является **хиральным центром** (от греч. *chiros* — рука; для некоторых хиральных молекул очень подходят модели левой и правой руки). Молекула с единственным хиральным центром может иметь два стереоизомера; при наличии двух или более (n) хиральных центров возможно существование 2^n стереоизомеров. Структуры некоторых стереоизомеров являются зеркальными отражениями друг друга; их называют **энантиомерами** (рис. 1-19). Пары стереоизомеров, которые не являются зеркальными отражениями, называют **диастереомерами** (рис. 1-20).

Луи Пастер в 1848 г. первым обнаружил, что энантиомеры имеют практически идентичные химические свойства, но их можно различить при пропускании луча плоскополяризованного света (см. дополнение 1-2). Растворы индивидуальных (отделенных друг от друга) энантиомеров вращают плоскость поляризации плоскополяризованного света в противоположных направлениях, но их эквимоллярные растворы (**рацемические смеси**) не обладают оптической активностью. Соединения, не имеющие хиральных центров, не способны вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Учитывая важность стереохимической структуры в реакциях между биомолекулами (см. ниже), биохимик обязан называть и изображать структуру каждой молекулы таким образом, чтобы ее стереохимия была очевидной. Для соединений, содержащих более одного хирального центра, наиболее подходящей номенклатурой является *R/S*-система, где определен *приоритет* каждого заместителя при хиральном атоме углерода:



В соответствии с *R/S*-системой молекулу нужно изображать таким образом, чтобы хиральный атом оказывался перед функциональной группой с наименьшим приоритетом (положение 4 на схеме молекулы; с. 37). Если приоритет остальных трех групп (от 1 до 3) снижается по часовой стрелке, это *R*-конфигурация (от лат. *rectus* — правый); если приоритет трех групп снижается против часовой стрелки, это *S*-конфигурация (от лат. *sinister* — левый). Таким образом, любой хиральный атом можно обозначить или как *R*, или *S*. При записи формулы соединения с хиральным центром необходимо указывать эти обозначения,

Дополнение 1–2 Луи Пастер и оптическая активность: *In vino veritas*

Луи Пастер столкнулся с явлением **оптической активности** в 1843 г. в процессе исследования кристаллических осадков, образующихся на дне бочек с вином (осадок в вине оказался винной кислотой, иначе называемой рацемической, от лат. *racemus* — кисть винограда). С помощью тонкого пинцета он разделял два типа кристаллов, которые были идентичны по форме, но как зеркальные отражения друг друга. Оба типа кристаллов имели все химические свойства винной кислоты, однако раствор одних кристаллов вращал плоскополяризованный свет влево (лево-вращающая форма), а раствор других кристаллов — вправо (правовращающая форма). Позднее Пастер описывал свой эксперимент:

*В изомерных телах элементы и их пропорции одинаковы, различается лишь расположение атомов... Нам известно, что, с одной стороны, молекулярная организация двух винных кислот асимметрична, а с другой стороны — что эта организация абсолютно идентична, за исключением направления этой асимметрии. Расположены атомы правовращающей формы кислоты в виде правозакрученной спирали или в вершинах неправильного тетраэдра, а может, они размещены каким-то другим асимметричным образом? Нам это неизвестно.**

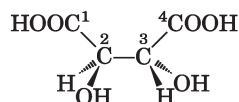
Теперь мы это знаем. Рентгенография кристаллов, осуществленная в 1951 г., подтвердила, что структуры лево- и правовращающих форм винной кислоты являются зеркальными отражениями друг

* Из лекции Пастера на заседании Химического общества в Париже в 1883 г; [DuBos, R. (1976) *Louis Pasteur: Free Lance of Science*, p. 95, Charles Scribner's Sons, New York].

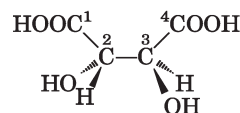


Луи Пастер, 1822–1895

друга; была также установлена абсолютная конфигурация каждой формы (рис. 1). С помощью того же подхода было продемонстрировано, что, хотя аминокислота аланин имеет две стереоизомера (L и D), в белках всегда присутствует только один из них (L-изомер, гл. 3).



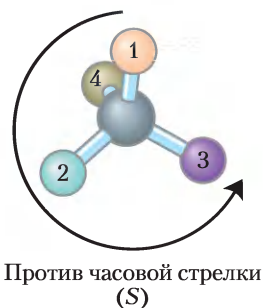
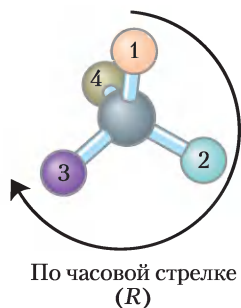
(2R,3R)-Винная кислота
(правовращающий изомер)



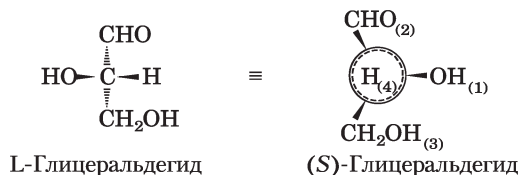
(2S,3S)-Винная кислота
(левовращающий изомер)

Рис. 1. Пастер разделил кристаллы двух стереоизомеров винной кислоты и показал, что растворы индивидуальных форм вращали плоскополяризованный свет в одинаковой степени, но в противоположных направлениях. Эти правовращающая и левовращающая формы были позднее названы (*R,R*)- и (*S,S*)-изомерами. Принцип *R/S*-номенклатуры изложен в тексте.

и тогда становится понятна стереохимия любого хирального центра.



Еще одна номенклатура стереоизомеров — D/L-система — рассматривается в гл. 3. Молекула с одним хиральным центром (например, два изомера глицеральдегида) может быть однозначно описана с помощью любой из этих систем. ■



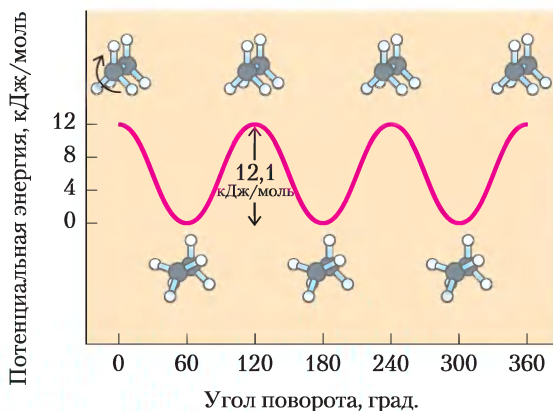


Рис. 1-21. Конформации. Благодаря свободе вращения вокруг связи С–С в молекуле этана возможно существование многих конформаций. Как показано на шаростержневой модели, если поворачивать ближайший к читателю атом углерода с тремя прикрепленными к нему атомами водорода относительно дальнего атома углерода, то потенциальная энергия молекулы достигает максимума в полностью заслоненной конформации (угол поворота 0° , 120° и т. д.) и минимума в полностью заторможенной конформации (угол поворота 60° , 180° и т. д.). Поскольку энергетические различия сравнительно невелики, то происходят быстрые взаимопревращения двух форм (миллионы раз в секунду), так что их нельзя выделить по одной.

Следует различать конфигурацию и **конформацию** молекулы — положение в пространстве заместителей в результате свободного вращения вокруг одинарных связей без разрыва каких-либо связей. Например, в молекуле простого углеводорода этана возможно практически свободное вращение относительно связи углерод–углерод. В результате в зависимости от угла поворота возможно существование нескольких переходящих друг в друга конформаций молекулы этана (**рис. 1-21**). Две конформации представляют особый интерес: заторможенная, наиболее стабильная и, следовательно, преобладающая, и заслоненная, наименее стабильная. Невозможно выделить вещество в одной из этих конформаций, поскольку переходы из одной конформации в другую происходят постоянно. Однако если один или более атомов водорода у каждого углерода заменить функциональной группой, которая имеет большой объем или несет заряд, то свобода вращения вокруг связи С–С ограничивается, что в свою очередь снижает число возможных устойчивых конформаций производных этана.

Взаимодействия между биомолекулами являются стереоспецифическими

Биологические взаимодействия между молекулами стереоспецифичны: они возможны лишь в случае «правильной» стереохимической структуры реагирующих веществ. Трехмерная структура мелких и крупных биологических молекул, т. е. структура с учетом конфигурации и конформации молекулы, играет весьма важную роль в биологических взаимодействиях, например между реагентом и его ферментом, гормоном и его рецептором на клеточной поверхности или антигеном и специфическим антителом (**рис. 1-22**). Изучению стереохимии биомолекул прецизионными физическими методами посвящено много исследований.

В живых организмах хиральные молекулы обычно присутствуют лишь в одной из возможных форм. Например, все аминокислоты в составе белков присутствуют исключительно в виде L-изомеров, а глюкоза встречается только в виде D-изомера. (Принципы номенклатуры стереоизомеров аминокислот изложены в гл. 3, сахаров — в гл. 7; для многих биомолекул наиболее



Рис. 1-22. Комплементарность макромолекулы и малой молекулы. Связывание белка с участком РНК из регуляторной области TAR в геноме вируса иммунодефицита человека (показан серым цветом) представлено на примере связывания амида аргинина (окрашенная молекула). Структура амида аргинина соответствует карману на поверхности РНК и удерживается в такой ориентации несколькими нековалентными связями с РНК. Данное изображение молекулы РНК получено с помощью компьютерной программы GRASP, которая позволила смоделировать форму внешней поверхности макромолекулы, исходя из ван-дер-ваальсовых радиусов всех атомов в молекуле или из параметра «исключенного объема», т. е. объема, в который не может проникнуть молекула воды.

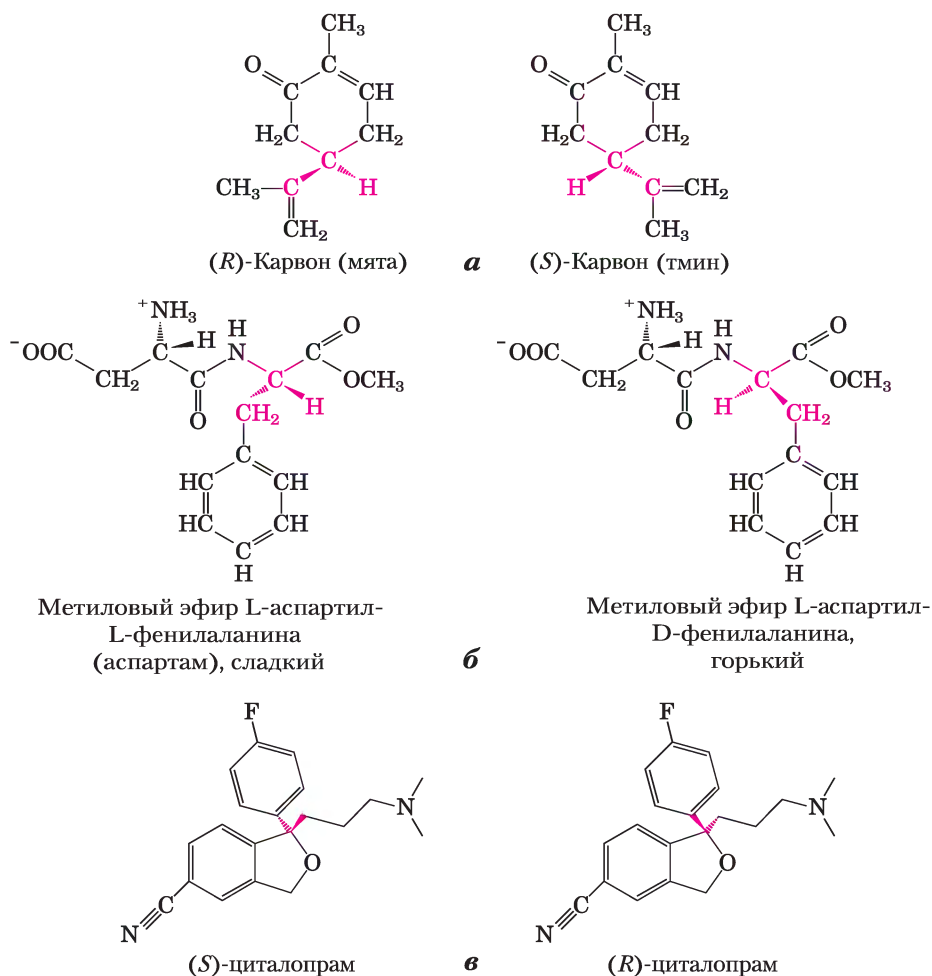


Рис. 1-23. Stereoisomers, различаемые человеком. а) Два стереоизомера карвона: (R)-карвон, выделяемый из масла мяты, имеет специфический мятный аромат; (S)-карвон из семян тмина пахнет тмином. б) Аспартам — это искусственный заменитель сахара, поступающий в продажу под разными торговыми названиями. Вкусовые рецепторы легко отличают его от горького стереоизомера, несмотря на то что эти вещества различаются лишь конфигурацией у одного из двух хиральных атомов углерода. в) Антидепрессант циталопрам (Целекса™) — селективный ингибитор обратного захвата серотонина; препарат представляет собой рацемическую смесь двух стереоизомеров, из которых только (S)-циталопрам оказывает терапевтическое действие. Stereoхимически чистый (S)-циталопрам (эсциталопрам оксалат) продается под торговым названием Лексапро. Как можно догадаться, эффективная доза Лексапро составляет половину эффективной дозы Целексы.

удобна R/S-номенклатура, изложенная выше.) Напротив, при лабораторном синтезе соединений с асимметрическим атомом углерода обычно образуются все возможные хиральные формы, например смесь L- и D-изомеров. Живые клетки создают только одну хиральную форму биомолекул, поскольку синтезирующие их ферменты также являются хиральными.

Stereoспецифичность, т. е. способность различать стереоизомеры, свойственна ферментам и другим белкам и является характерным элементом молекулярной «логики» живых организмов. Если участок связывания в молекуле белка комплементарен одному изомеру хирального соединения, он не может быть комплементарным другим изоформам по той же причине, по какой левая перчатка

не годится для правой руки. На **рис. 1-23** представлены замечательные парные примеры, иллюстрирующие способность биологических систем различать стереоизомеры.

Основные типы химических реакций, встречающихся в биохимии, рассмотрены в гл. 13 (перед обсуждением путей метаболизма).

Краткое содержание раздела 1.2. ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОХИМИИ

- Благодаря многообразию связей углерода возможно существование широкого набора углеродных скелетов с различными функциональными группами, придающими биомолекулам биологическую и химическую специфичность.
- В живых клетках встречается практически универсальный набор из нескольких сотен небольших молекул. Основные пути взаимных метаболических превращений этих молекул мало изменились в процессе эволюции.
- Белки и нуклеиновые кислоты представляют собой линейные полимеры, состоящие из простых мономерных звеньев; их последовательность несет информацию, определяющую трехмерную структуру и биологические функции каждой молекулы.
- Конфигурация молекулы изменяется только с разрывом ковалентной связи. Если атом углерода имеет четыре разных заместителя (хиральный атом), то эти заместители могут располагаться в пространстве двумя различными способами, образуя различающиеся по свойствам стереоизомеры. Биологической активностью обладает только один стереоизомер. Конформация молекулы определяет положение составляющих ее атомов в пространстве, которое может изменяться путем вращения атомов вокруг одинарных связей без разрыва ковалентных связей.
- Взаимодействия между биомолекулами практически всегда стереоспецифичны: они требуют точной комплементарности реагирующих молекул.

1.3. Физические основы биохимии

Для обеспечения жизнедеятельности и самовоспроизведения живые организмы должны выполнять определенную работу. Реакции синтеза, протекающие в клетках, как и процессы синтеза на производстве, требуют энергетических затрат. Энергия расходуется при движении бактерии и беге спринтера на Олимпийских играх, при полете светлячков и при электрическом разряде угля. Хранение и передача информации также требуют затрат энергии, без которой богатые информацией молекулы неизбежно утратили бы свою структуру и значение.

В процессе эволюции клетки создали высокоэффективные механизмы использования энергии солнечного света или топливных молекул для осуществления многочисленных процессов, протекающих с затратой энергии. Одной из задач биохимии является количественное описание процессов получения, передачи и расходования энергии живыми клетками в химических терминах. Превращения энергии в клетке, как и все другие процессы преобразования энергии, можно рассматривать с учетом законов термодинамики.

Живые организмы находятся в динамическом стационарном состоянии, но не в равновесии с окружающей средой

Молекулы и ионы в живых организмах по типу и концентрации отличаются от тех, что находятся в окружающей среде. Парамеция в пруду, акула в океане, бактерия в почве, яблоня в саду — все они отличаются по составу от окружающего их мира. Кроме того, по достижении зрелости они поддерживают свой состав более или менее постоянным, несмотря на непрерывно меняющиеся внешние условия.

Хотя характерный состав живого организма слабо изменяется со временем, но набор молекул внутри него вовсе не находится в статическом состоянии. Небольшие молекулы, макромолекулы и надмолекулярные структуры непрерывно синтезируются и распадаются в химических реакциях, сопровождающихся постоянным оборотом вещества и энергии в системе. Молекулы гемоглобина, которые вот в этот самый момент переносят кислород от наших легких к мозгу, были синтезированы в прошлом месяце. К следующему месяцу они будут уничтожены и полностью заменены новыми. Глюкоза, которую ваш организм получил при последнем приеме пищи, сейчас циркулирует у вас в кровотоке. До конца дня эти

молекулы глюкозы превратятся во что-то еще, возможно, в углекислый газ или жир, и будут заменены новой глюкозой, так что ее концентрация в крови остается более или менее постоянной на протяжении всего дня. Количество гемоглобина и глюкозы в крови относительно постоянно, поскольку скорость синтеза или захвата каждого из этих веществ совпадает со скоростью их разложения, потребления или превращения в другие продукты. Постоянство концентрации является результатом динамического стационарного состояния, которое далеко от равновесия. Поддержание этого стационарного состояния требует затрат энергии. Если клетка не может более производить энергию, она погибает и начинает разлагаться, приходя к равновесию с окружающей средой. Ниже мы подробнее обсудим суть понятий «стационарное состояние» и «равновесие».

Организмы перерабатывают энергию и вещества из окружающей среды

Химическую реакцию в растворе можно представить как **систему**, включающую все реагирующие вещества, продукты реакции и растворитель, а также некоторый объем атмосферного воздуха вблизи, короче говоря, всего, что содержится в определенной области окружающей пространства. Эта система и окружающая среда вместе составляют **вселенную**. Если система не обменивается веществом и энергией с окружающей средой, ее называют **изолированной**. Если система обменивается с окружающей средой энергией, но не обменивается материей (веществом), ее называют **закрытой**. Если происходит обмен и энергией, и материей, это **открытая система**.

Живой организм представляет собой открытую систему: он обменивается с окружающей средой энергией и материей. Живые организмы могут получать энергию двумя способами: 1) путем захвата из окружающей среды химического топлива (например, глюкозы) и его окисления (см. дополнение 1-3, случай 2); 2) путем поглощения солнечного света.

Первый закон термодинамики постулирует *принцип сохранения энергии*: при любых химических или физических процессах общее количество энергии в системе остается постоянным, хотя форма энергии может изменяться. Клетки способны виртуозно трансформировать химическую, электромагнитную, механическую и осмотическую энергию с очень высокой эффективностью (рис. 1-24).

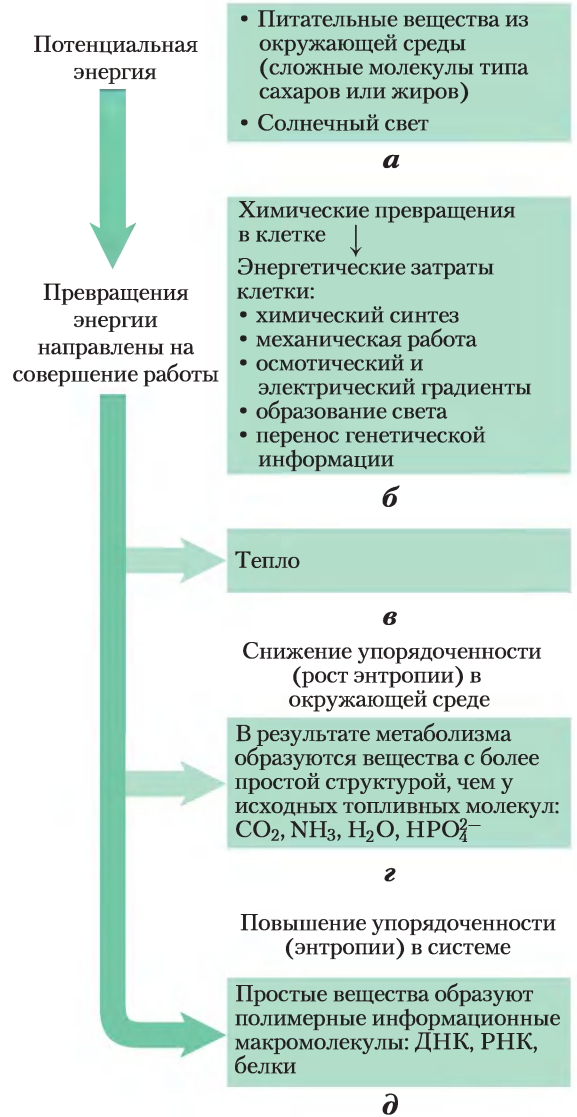


Рис. 1-24. Некоторые пути превращения энергии в живых организмах. Энергетические превращения в процессе метаболизма сопровождаются увеличением беспорядка системы и окружающего ее пространства, выраженной в терминах энтропии, по мере снижения потенциальной энергии сложных молекул питательных веществ. а) Живые организмы получают энергию из окружающей среды; б) переводят некоторое количество энергии в необходимую клеткам форму; в) возвращают некоторое количество энергии в виде тепла в окружающую среду; г) выделяют конечные продукты, молекулы которых менее организованы, чем исходные топливные молекулы, что повышает энтропию системы. Одним из результатов этих превращений является д) рост упорядоченности (уменьшение энтропии) в системе, что связано с синтезом сложных макромолекул. В гл. 13 мы вернемся к разговору о количественном выражении энтропии.

Дополнение 1–3 Энтропия: преимущество беспорядка

Термин «энтропия», буквально означающий «изменение внутри», впервые был использован в 1851 г. Рудольфом Клаузиусом, автором одной из формулировок второго начала термодинамики. Для того чтобы определить энтропию количественно требуется привлечение математической статистики и теории вероятности, однако суть этого понятия на качественном уровне можно объяснить с помощью трех простых примеров, каждый из которых иллюстрирует один из аспектов энтропии. Здесь такие основные определения энтропии, как «хаотичность» и «беспорядок», проявляются с разных сторон.

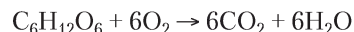
Пример 1: Горячий чайник и рассеяние тепла

Нам известно, что пар, образующийся при кипении воды, может совершать полезную работу. Однако предположим, что мы выключаем конфорку под чайником с кипящей (температура 100 °С) водой (это наша «система») на кухне («окружающая среда») и даем чайнику остыть. По мере его остывания никакой видимой работы не совершается, но тепло от горячего чайника поступает в окружающую среду, повышая температуру на кухне на бесконечно малую величину, пока не установится равновесие. В момент равновесия чайник (с водой), воздух и предметы на кухне имеют одинаковую температуру. Свободная энергия, сосредоточенная в чайнике с кипятком, потенциально способна совершать работу. Эквивалентная этой энергии тепловая энергия все еще присутствует в кипятке (чайнике) и на кухне (т. е. во «вселенной»), однако в полностью рассеянном виде. Эту энергию больше нельзя использовать для совершения работы, поскольку на кухне температура везде одинакова. Более того, повышение энтропии окружающей среде (на кухне) необратимо. Из собственного опыта мы знаем, что тепло никогда не вернется из окружающего воздуха в чайник и температура воды в чайнике не может самопроизвольно подняться до 100 °С (и даже на несколько градусов).

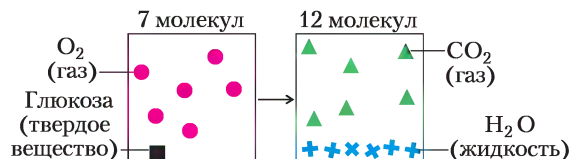
Пример 2: Окисление глюкозы

Энтропия характеризует состояние не только энергии, но и вещества. Аэробные (гетеротрофные) организмы используют свободную энергию полученной из внешней среды глюкозы путем ее окисления кислородом, также полученным из внешней среды. Конечные продукты этого окислительного метаболизма — CO_2 и H_2O — возвращаются в окружающую среду. В результате данного процесса в окружающей среде происходит рост энтропии, в то время как внутри самого

организма сохраняется стационарное состояние, и в его внутреннем порядке не происходит никаких изменений. Некоторый рост энтропии связан не только с выделением тепла, но и с другим типом беспорядка, как следует из уравнения окисления глюкозы:



Мы можем показать это на схеме:



В результате реакции окисления атомы, составлявшие 1 молекулу глюкозы и 6 молекул кислорода (всего 7 молекул), рассредоточились в менее упорядоченной системе, так как теперь число молекул равно 12 ($6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$).

В любой химической реакции, приводящей к увеличению числа молекул (или к превращению твердого вещества в жидкое или газообразное, молекулы которого перемещаются более свободно), упорядоченность системы снижается, следовательно, повышается энтропия.

Пример 3: Энтропия и информация

Приведенный ниже короткий фрагмент монолога Брута при приближении армии Марка Антония («Юлий Цезарь», акт IV, сцена 3) представляет собой содержащий информацию осмысленный набор слов, составленный из 25 букв английского алфавита:

There is a tide in the affairs of men,
Which, taken at the flood, leads on to fortune;
Omitted, all the voyage of their life
Is bound in shallows and in miseries.*

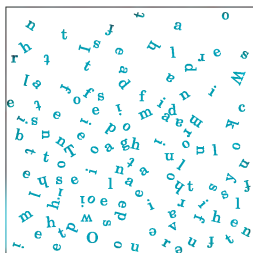
Кроме явного смысла слов здесь многое скрыто скрытого — имеется указание на сложное сплетение событий, разыгрываемых в пьесе, а также отражены взгляды автора на сам конфликт, амбиции героев и их жажду к превосходству (первенству). Этот маленький фрагмент,

*В делах людей прилив есть и отлив,
С приливом достигаем мы успеха.
Когда ж отлив наступит, лодка жизни
По отмелям несчастий волочится.

(Перевод М. Зенкевича)

пронизанный шекспировским пониманием человеческой природы, очень насыщен информацией.

Однако если использованные в этом фрагменте 125 букв расставить в случайном порядке, как пока-

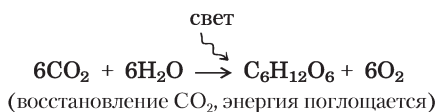


зано в рамке, они вообще не будут иметь никакого смысла.

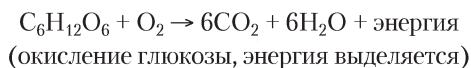
В данном случае 125 букв не несут никакой информации, но характеризуются очень высокой энтропией. Подобные рассуждения помогают нам понять, что информация является формой энергии, ее называют «отрицательной энтропией». Раздел математики, называемый теорией информации лежит в основе логики компьютерного программирования и тесно связан с термодинамикой. Живые организмы являются высокоупорядоченными структурами, чрезвычайно насыщенными информацией, и потому характеризуются низкой энтропией.

Поток электронов обеспечивает организм энергией

Практически все живые организмы прямо или косвенно добывают энергию из солнечной радиации, являющейся результатом термоядерных реакций на Солнце. В процессе фотосинтеза происходящее под действием солнечного света расщепление воды приводит к высвобождению электронов для восстановления CO_2 и к выделению в атмосферу молекулярного кислорода:



Нефотосинтезирующие клетки и организмы получают необходимую им энергию путем окисления энергетически богатых продуктов фотосинтеза и передачи электронов от этих молекул на атмосферный кислород с образованием воды, CO_2 и других конечных продуктов, что приводит к их рециркуляции в окружающей среде:



Автотрофы и гетеротрофы участвуют в глобальных циклах углерода и кислорода, управляемых солнечным светом, в результате эти две большие группы организмов зависят друг от друга. Практически все преобразования энергии в клетке можно проследить по потоку электронов от од-

ной молекулы к другой от более высокого к более низкому электромеханическому потенциалу. По формальным признакам этот процесс аналогичен потоку электронов в электрической цепи, работающей от батарейки. Все реакции с переносом электронов являются **ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫМИ**: один реагент окисляется (отдает электроны), а другой восстанавливается (принимает электроны).

Создание и поддержание порядка требуют совершения работы и затрат энергии

Как уже было сказано, ДНК, РНК и белки представляют собой информационные макромолекулы; последовательность мономерных звеньев в них несет определенную информацию — как последовательность слов в предложении. Клетка затрачивает энергию не только на создание ковалентных связей между звеньями этих полимеров, но и на сборку их в строго определенном порядке. Чрезвычайно важно, чтобы аминокислоты из смеси выстроились в специфической последовательности в определенную белковую молекулу. Это приведет к увеличению упорядоченности в популяции молекул. Однако в соответствии со вторым началом термодинамики в природе существует тенденция к усилению беспорядка: *общая энтропия Вселенной постоянно растет*. Таким образом, для осуществления синтеза макромолекул из мономерных единиц система (в данном случае клетка) должна получить энергию.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Для количественного выражения беспорядка или хаотичности среди компонентов химической системы используют специальный параметр — **энтропию S** (см. дополнение 1-3). Любые изменения хаотичности системы выражаются как изменение энтропии ΔS , которое в соответствии с принятыми договоренностями считают положительными при росте энтропии. Дж. Уиллард Гиббс, разивший теорию



Дж. Уиллард Гиббс, 1839–1903

энергетических изменений в процессе химической реакции, показал, что **свободную энергию (энергию Гиббса, G)** любой закрытой системы можно описать тремя параметрами: **энтальпией (H)**, отражающей число и тип связей, **энтропией (S)** и **абсолютной температурой (T)**, выраженной в кельвинах. Уравнение для свободной энергии выглядит следующим образом: $G = H - TS$. Если химическая реакция протекает при постоянной температуре, то изменение свободной энергии (ΔG) определяется изменением энтальпии (ΔH), отражающим тип и число образующихся и разрушающихся химических связей и нековалентных взаимодействий, а также изменением энтропии (ΔS), отражающим изменение хаотичности в системе:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

где, по определению, для реакции, происходящих с выделением тепла, $\Delta H < 0$, а $\Delta S > 0$ (беспорядок в системе увеличивается). ■

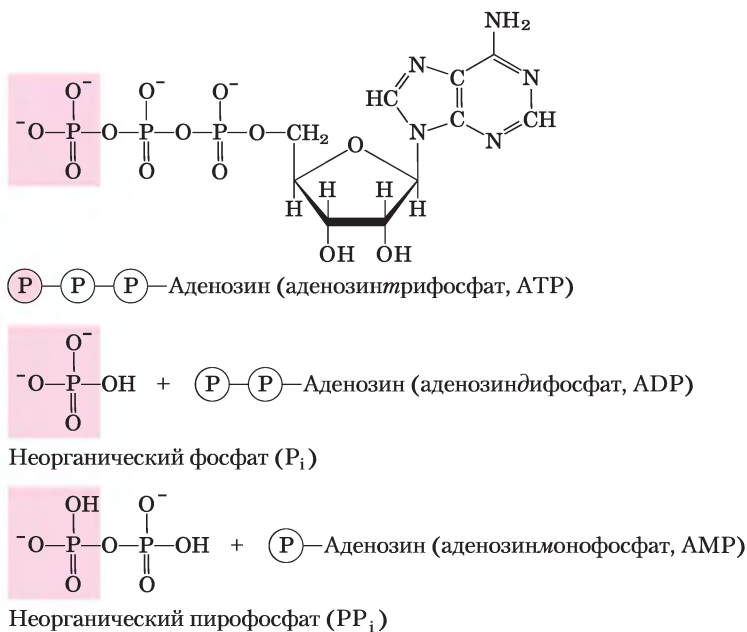


Рис. 1-25. Молекула аденозинтрифосфата (АТФ) как источник энергии. Здесь буквой P обозначены фосфорильные группы. Удаление от АТФ концевой фосфорильной группы (выделена розовым цветом) в результате расщепления фосфоангидридной связи приводит к образованию аденозиндифосфата (ADP) и неорганического фосфат-иона (HPO_4^{2-}). Этот экзергонический процесс сопряжен со многими эндергоническими процессами в клетке (как в примере на рис. 1-26, б). Кроме того, АТФ является источником энергии для многих клеточных процессов: в реакции расщепления АТФ теряет две концевые фосфорильные группы, что приводит к образованию неорганического пирофосфата ($\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-}$), часто обозначаемого PP_i .

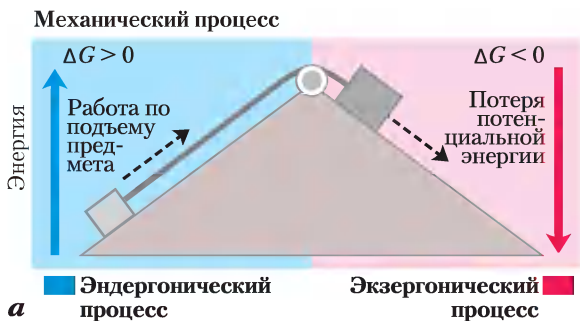
Реакция может протекать самопроизвольно только если $\Delta G < 0$ (энергия *выделяется*). Однако функционирование клетки в значительной степени зависит от таких молекул, как белки и нуклеиновые кислоты, для которых свободная энергия образования $\Delta G_f > 0$: они менее стабильны и гораздо более упорядочены, чем смесь их мономерных звеньев. Для осуществления термодинамически невыгодных (**эндергонических**) реакций клетка сопрягает их с другими реакциями, которые протекают с высвобождением свободной энергии (**экзергонические** реакции), так что суммарный процесс становится энергетически выгодным: $\Delta H < 0$. Обычным источником энергии в сопряженных биологических реакциях является гидролиз фосфоангидридных связей, например, в молекулах аденозинтрифосфата (АТФ, **рис. 1-25**) и гуанозинтрифосфата (GTP). Как \textcircled{P} обозначены фосфорильные группы:

Аминокислоты \rightarrow Белок

$\Delta G_1 > 0$
(эндергонический процесс)

АТФ \rightarrow AMP + \textcircled{P} – \textcircled{P}
или АТФ \rightarrow ADP + \textcircled{P}

$\Delta G_2 < 0$
(экзергонический процесс)



При сопряжении этих двух реакций суммарный процесс экзергонический ($\Delta G_1 + \Delta G_2 < 0$). Используя такую стратегию сопряжения, клетки синтезируют и поддерживают богатые информацией молекулы, необходимые для их жизни.

Энергетическое сопряжение в биологических реакциях

При изучении *биоэнергетики* (науки о превращениях энергии в живых системах) основное внимание уделяется сопряженным процессам, в которых энергия, получаемая при метаболизме топливных молекул или от солнечного света, расходуется на осуществление реакций, идущих в клетке с затратами энергии. В связи с этим полезно рассмотреть простую задачу из курса механики (**рис. 1-26, а**). Предмет, находящийся на вершине наклонной плоскости, обладает определенной потенциальной энергией, поскольку он поднят на некоторую высоту. Предмет скользит вниз по плоскости и при этом теряет свою потенциальную энергию. Если с помощью блока соединить этот скользящий предмет с меньшим по размеру предметом, то самопроизвольное скольжение большого предмета будет поднимать маленький, т. е. совер-

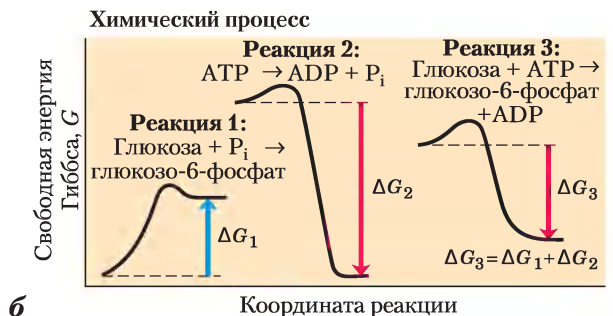


Рис. 1-26. Энергетическое сопряжение при механических и химических процессах. *а*) Движение предмета вниз высвобождает потенциальную энергию, с помощью которой можно осуществить механическую работу. Потенциальная энергия, высвобождаемая в результате самопроизвольного движения вниз (экзергонический процесс, показан розовым цветом), может быть использована для подъема другого предмета (эндергонический процесс, показан голубым цветом). *б*) Образование глюкозо-6-фосфата из глюкозы и неорганического фосфата (P_i) по реакции 1 приводит к образованию продукта, более богатого энергией, чем исходные вещества. В этой эндергонической реакции $\Delta G > 0$. Экзергонический процесс гидролиза АТФ (реакция 2) характеризуется большим отрицательным значением ΔG_2 . Суммарная реакция, составленная из реакций 1 и 2, характеризуется изменением свободной энергии $\Delta G_3 = \Delta G_1 + \Delta G_2$. Поскольку $\Delta G_3 < 0$, суммарная реакция является экзергонической и может протекать самопроизвольно.

шится определенная работа. Количество энергии, доступное для совершения работы, равно **изменению свободной энергии Гиббса (ΔG)**. Величина высвобождаемой энергии всегда несколько меньше теоретического значения, поскольку часть энергии рассеивается в виде тепла. Чем выше поднят большой предмет, тем больше энергии (ΔG) высвобождается по мере его скольжения вниз и тем большую работу можно выполнить за счет этой энергии. Более крупный объект может поднять более мелкий объект лишь за счет того, что вначале более крупный объект *был далек от положения равновесия*: в какой-то более ранний момент времени он был поднят над землей с затратой определенной энергии.

Как все сказанное применить к химической реакции? В закрытых системах химические реакции протекают самопроизвольно до достижения состояния **равновесия**. При равновесии скорость образования продуктов реакции равна скорости обратной реакции их превращения в исходные вещества. Таким образом, концентрации реагирующих веществ и продуктов реакции не изменяются — достигается стационарное состояние. Изменение энергии системы от исходного состояния к равновесию (при постоянной температуре и давлении) определяется изменением свободной энергии (ΔG). Величина ΔG зависит от конкретной химической реакции и от удаленности исходной системы от состояния равновесия. Каждое вещество, участвующее в реакции, обладает определенной потенциальной энергией, которая зависит от типа и числа имеющихся в нем связей. В самопроизвольно протекающих реакциях энергия образующихся продуктов меньше, чем у реагирующих веществ, так что в результате реакции энергия высвобождается, и ее можно использовать на совершение работы. Это экзергонические реакции, в которых разность свободной энергии реагирующих веществ и продуктов — отрицательная величина. Для осуществления эндергонических реакций необходимо затратить энергию, ΔG — положительная величина. Аналогично тому, как это происходит в механическом процессе, только часть энергии, высвобождаемой в экзергонической химической реакции, может быть использована для совершения работы. В живых системах часть энергии излучается в виде тепла или теряется при увеличении энтропии.

В живых организмах, как и в примере на рис. 1-26, *а*, для осуществления энергетически невыгодной эндергонической реакции она может быть сопряжена с экзергонической. На рис. 1-26, *б* в виде графиков, называемых энергетическими диаграммами, продемонстрировано превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат — первый этап метаболического пути окисления глюкозы. Простейшим способом получения глюкозо-6-фосфата является следующий:

Реакция 1: Глюкоза + $P_i \rightarrow$ глюкозо-6-фосфат
($\Delta G > 0$, эндергоническая реакция).

P_i — неорганический фосфат $НРО_4^{2-}$. Сейчас не будем останавливаться на структуре участвующих в реакции соединений, мы подробно поговорим об этом позже. Данная реакция не может протекать самопроизвольно, поскольку $\Delta G > 0$. Напротив, вторая реакция экзергоническая и может протекать в любых клетках:

Реакция 2: $АТФ \rightarrow АDР + P_i$
($\Delta G < 0$, экзергоническая реакция).

В реакциях 1 и 2 участвует неорганический фосфат P_i ; он потребляется в реакции 1 и выделяется в реакции 2. При суммировании реакций 1 и 2 неорганический фосфат сокращается.

Реакция 3: Глюкоза + $АТФ \rightarrow$
глюкозо-6-фосфат + $АDР$.

В реакции 2 выделяется больше энергии, чем расходуется в реакции 1, поэтому в реакции 3 $\Delta G_3 < 0$, следовательно, синтез глюкозо-6-фосфата может протекать по реакции 3.

Сопряжение экзергонических и эндергонических реакций, имеющих общие промежуточные продукты, — важнейший принцип энергетического обмена в живых организмах. Как мы увидим, в результате реакций, протекающих с распадом $АТФ$ (как реакция 2 на рис. 1-26, *б*), высвобождается энергия, позволяющая протекать многим эндергоническим реакциям в клетке. Распад $АТФ$ в клетке является экзергоническим процессом по той причине, что *во всех живых клетках концентрация $АТФ$ превышает его равновесную концентрацию*. Именно это отклонение от равновесия делает $АТФ$ основным источником химической энергии в клетке.

На возможность самопроизвольного протекания реакции указывают K_{eq} и ΔG°

Способность реакции протекать до конца можно выразить с помощью константы равновесия. Для реакции, где a моль вещества А взаимодействует с b моль вещества В, с образованием c моль вещества С и d моль вещества D



константа равновесия K_{eq} или просто K определяется *равновесными концентрациями* исходных веществ и продуктов реакции:

$$K = [C_{\text{eq}}]^c [D_{\text{eq}}]^d / [A_{\text{eq}}]^a [B_{\text{eq}}]^b,$$

где $[A_{\text{eq}}]$ — концентрация А, $[B_{\text{eq}}]$ — концентрация В и т. д. в *состоянии равновесия*. Высокое значение K означает, что реакция протекает до тех пор, пока реагирующие вещества практически полностью не превратятся в продукты реакции.

Гиббс показал, что ΔG (изменение свободной энергии) любой химической реакции является функцией **изменения стандартной свободной энергии (ΔG°)**, характеристического параметра реакции, и концентраций исходных веществ и продуктов реакции:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[C_{\text{исх}}]^c [D_{\text{исх}}]^d}{[A_{\text{исх}}]^a [B_{\text{исх}}]^b}, \quad (1-1)$$

где $[A_{\text{исх}}]$ — исходная концентрация А и т. д., R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура.

ΔG — это мера отклонения системы от положения равновесия. При достижении равновесия осуществление работы невозможно: $\Delta G = 0$. В данном случае $[A_{\text{исх}}] = [A_{\text{eq}}]$ и т. д. для всех реагирующих веществ и продуктов реакции, так что

$$\frac{[C_{\text{исх}}]^c [D_{\text{исх}}]^d}{[A_{\text{исх}}]^a [B_{\text{исх}}]^b} = \frac{[C_{\text{eq}}]^c [D_{\text{eq}}]^d}{[A_{\text{eq}}]^a [B_{\text{eq}}]^b}.$$

Подставляя в уравнение 1-1 $\Delta G = 0$ и $K = \frac{[C_{\text{исх}}]^c [D_{\text{исх}}]^d}{[A_{\text{исх}}]^a [B_{\text{исх}}]^b}$, получаем

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{\text{eq}}$$

из которого видно, что ΔG° — это еще один способ (кроме K_{eq}) выражения движущей силы реакции. Поскольку K_{eq} можно измерить экспериментально,

мы можем вычислить ΔG° — характеристический термодинамический параметр реакции.

Единицей измерения ΔG и ΔG° является Дж/моль или кал/моль. При $K_{\text{eq}} \gg 1$ ΔG° — большое отрицательное число, при $K_{\text{eq}} \ll 1$ ΔG° — большое положительное число. Из таблиц экспериментальных значений K_{eq} или ΔG° можно легко определить, какие реакции идут до конца, а какие нет.

Следует сделать одно замечание относительно интерпретации ΔG° : *термодинамические* константы подобного рода указывают, где (при каких концентрациях веществ) устанавливается равновесие реакции, но они ничего не говорят о том, как быстро достигается равновесие. Скорости реакций подчиняются законам *кинетики*; на этом мы остановимся в гл. 6.

Ферменты способствуют ускорению химических реакций

Все биологические макромолекулы термодинамически гораздо менее стабильны, чем их мономерные звенья, но с точки зрения *кинетики* они весьма *устойчивы*: без катализатора их распад протекает настолько медленно (длительность процесса измеряется годами), что во временной шкале, в которой существуют живые организмы, их можно считать устойчивыми. Практически все химические реакции в клетке протекают со значительными скоростями только благодаря наличию **ферментов** — биологических катализаторов, которые, как и любые другие катализаторы, многократно повышают скорость специфических химических реакций и при этом в данных реакциях не расходуются.

Путь от реагирующего вещества (или веществ) к продукту (продуктам) практически неизбежно проходит через энергетический барьер, называемый активационным барьером (**рис. 1-27**). Для протекания реакции необходимо преодолеть этот барьер (сообщить системе энергию, равную энергии активации). При разрыве и создании связей обычно возникает переходное состояние с более высокой свободной энергией, чем у реагирующих веществ и продуктов реакции. На энергетической диаграмме переходное состояние находится в наивысшей точке, а разница энергий исходных веществ в основном и в переходном состоянии называется **энергией активации ΔG^\ddagger** . Фермент катализирует реакцию путем создания

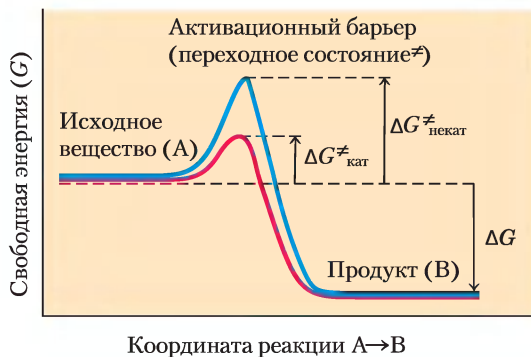


Рис. 1-27. Изменения энергии при химической реакции. Активационный барьер (характеризующий переходное состояние, см. гл. 6) в реакции превращения исходного вещества А в продукт В должен быть преодолен, даже при условии, что продукты реакции более стабильны, чем исходные вещества (большое отрицательное значение ΔG). Энергию, необходимую для преодоления активационного барьера, называют энергией активации (ΔG^*). Ферменты катализируют реакцию, снижая активационный барьер. Они связываются с молекулами, находящимися в переходном состоянии, и эта энергия связывания снижает энергию активации со значения $\Delta G^*_{\text{некат}}$ (синяя кривая) до $\Delta G^*_{\text{кат}}$ (красная кривая). (Заметьте, что энергия активации не связана с изменением свободной энергии ΔG .)

подходящих условий для достижения переходного состояния, он комплементарен структуре переходного состояния по стереохимии, полярности и заряду. Связывание фермента с веществом в переходном состоянии является экзергоническим процессом; энергия, которая выделяется в результате этого связывания, снижает энергию активации данной реакции и значительно повышает скорость процесса.

Еще одним достоинством ферментативного катализа является возможность связывания двух или большего числа реагирующих веществ на поверхности фермента на близком расстоянии друг от друга и в стереоспецифической ориентации, благоприятной для протекания реакции. Это на несколько порядков повышает вероятность продуктивных столкновений между реагирующими веществами. В результате действия перечисленных и некоторых других факторов, обсуждаемых в гл. 6, скорости ферментативных реакций примерно в 10^{12} раз превышают скорости некатализируемых реакций. (Это в миллион миллионов раз быстрее!)

Биологические катализаторы, за редкими исключениями, представляют собой белки (иногда каталитические функции может выполнять

молекула РНК, см. гл. 26 и 27). Опять же за немногими исключениями, каждый фермент катализирует специфическую реакцию, и каждая реакция в клетке катализируется особым ферментом. Понятно, что каждой клетке необходимы тысячи различных ферментов. Многообразие ферментов, их специфичность (способность различать реагирующие вещества) и возможность регуляции позволяют клетке селективно снижать активационные барьеры. Эта селективность чрезвычайно важна для эффективной регуляции клеточных процессов. Позволяя тем или иным реакциям протекать со значительными скоростями в определенные периоды времени, ферменты регулируют перенос веществ и энергии в клеточных процессах.

Тысячи ферментативных химических реакций в клетке организованы в многочисленные последовательности, называемые **метаболическими путями**, в которых продукт одной реакции является исходным веществом для другой. Некоторые метаболические пути служат для разложения органических веществ до простых конечных продуктов, а высвобождаемая химическая энергия направляется на необходимые клетке нужды. Вместе все реакции разложения, протекающие с высвобождением энергии, называют **катаболизмом**. Энергия, выделяющаяся в реакциях катаболизма, расходуется для синтеза АТФ. Благодаря этому внутриклеточная концентрация АТФ значительно превышает его равновесную концентрацию, так что для реакции распада АТФ $\Delta G \ll 0$. В реакциях метаболизма образуются переносчики электронов в восстановленной форме — NADH и NADPH, причем обе молекулы могут отдавать электроны в процессах, идущих с образованием АТФ, или способствовать протеканию восстановительных стадий в реакциях биосинтеза.

Другие метаболические пути начинаются от небольших молекул-предшественников и превращают их во все более крупные и сложные молекулы, в том числе белки и нуклеиновые кислоты. Такие реакции синтеза, которые неизбежно протекают с затратой энергии, вместе называют **анаболизмом**. Общая сеть ферментативных реакций составляет **метаболизм** клетки. АТФ, а также эквивалентные ему по энергетическому содержанию нуклеозидтрифосфаты цитидинтрифосфат (СТР), уридинтрифосфат (УТР) и гуанозинтрифосфат (ГТР) являются связующим

звеном между катаболическими и анаболическими элементами этой сети (см. схему на [рис. 1-28](#)). Метаболические пути, затрагивающие основные вещества в клетке — белки, жиры, углеводы и нуклеиновые кислоты, практически идентичны во всех живых организмах.

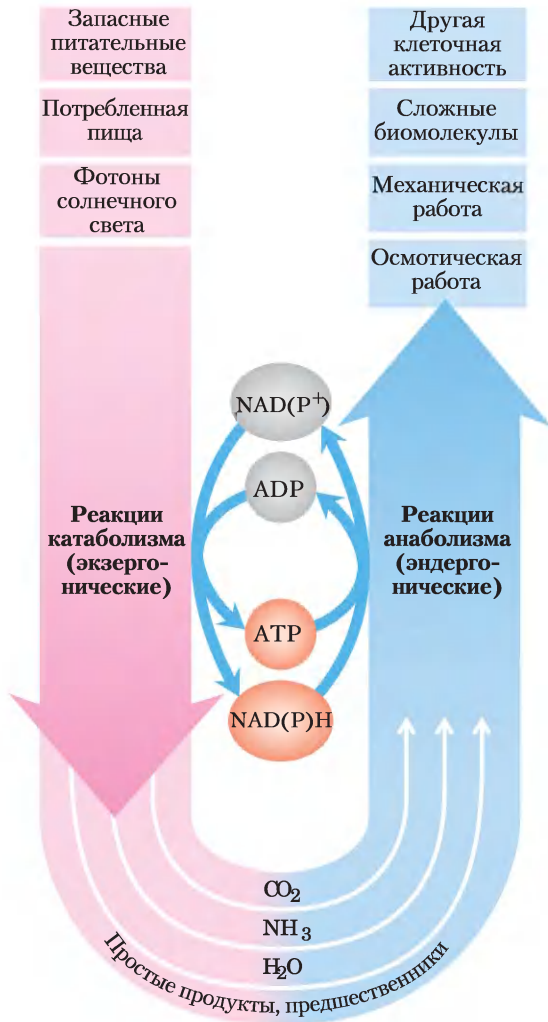
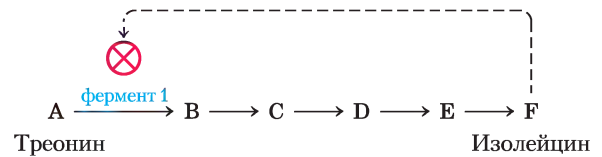


Рис. 1-28. Роль АТФ в метаболизме. АТФ является интермедиатом многих процессов, идущих с потреблением и с выделением энергии. Его значение для клетки сравнимо со значением денег для экономики: он «зарабатывается/производится» в экзергонических реакциях и «тратится/потребляется» в эндергонических реакциях. Никотинамиддениндинуклеотид(фосфат) NAD(P)H — переносчик электронов, который принимает электроны, высвобождающиеся в окислительных реакциях, а затем отдает их в различных восстановительных реакциях биосинтеза. В клетке этот важный для анаболических процессов кофактор присутствует в сравнительно низкой концентрации, поэтому он должен постоянно генерироваться в процессах катаболизма.

Сбалансированная и экономичная работа клетки достигается путем регуляции метаболизма

Живые клетки не только постоянно синтезируют тысячи разных углеводов, белков, жиров, нуклеиновых кислот и их мономеров, но производят их ровно в том количестве, которое необходимо клетке в конкретных условиях. Например, в условиях быстрого роста необходимо большое количество предшественников белков и нуклеиновых кислот, а при отсутствии роста их нужно гораздо меньше. Ключевые ферменты всех метаболических путей регулируются таким образом, чтобы каждый тип молекул-предшественников синтезировался в необходимом в данный момент количестве.

Рассмотрим метаболический путь синтеза аминокислоты изолейцина в клетках *E. coli*. Этот метаболический путь имеет пять стадий, которые катализируют пять различных ферментов (интермедиаты процесса обозначены буквами от А до F):



Если клетка начинает производить изолейцина больше, чем нужно для синтеза белка, то неиспользованные молекулы изолейцина накапливаются и ингибируют каталитическую активность первого фермента данного метаболического пути, что немедленно приводит к снижению уровня синтеза изолейцина. Такая **регуляция по принципу обратной связи** поддерживает баланс между образованием и расходом метаболитов. (По всей книге символом \otimes обозначено ингибирование ферментативной реакции.)

Концепция дискретных метаболических путей важна для нашего понимания метаболизма, но она очень сильно упрощает реальную ситуацию. В клетке присутствуют тысячи метаболитов, многие из которых задействованы далеко не в одном метаболическом пути. Метаболизм правильнее представлять как сеть взаимосвязанных и взаимозависимых путей. Изменение концентрации лишь одного метаболита может сказаться на других метаболических путях и привести к переходу на другие пути преобразования веществ. Кажется невозможным понять и количественно

описать столь сложный комплекс взаимосвязей между метаболитами и метаболическими путями, однако существуют новые подходы к решению этой проблемы (гл. 15), которые уже вносят важный вклад в понимание системы общей регуляции метаболизма. Кроме того, клетки регулируют синтез своих собственных катализаторов — ферментов — в ответ на возрастание или снижение потребности в том или ином продукте метаболизма; этот вопрос рассматривается в гл. 28. *Экспрессия* генов (перевод информации, содержащейся в ДНК, в клеточные белки) и синтез ферментов являются дополнительными уровнями контроля клеточного метаболизма, которые также необходимо учитывать при описании полной системы регуляции метаболизма в клетке.

Краткое содержание раздела 1.3 ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОХИМИИ

- Живые клетки — это открытые системы, которые обмениваются с окружающей средой и веществом, и энергией и используют энергию для поддержания внутри себя динамического стационарного состояния, далекого от равновесия с окружающей средой. Клетки добывают энергию из солнечного света или топливных молекул и превращают ее из потока электронов в химические связи в молекуле АТФ.
- Способность химической реакции приходить к равновесию можно выразить с помощью изменения свободной энергии Гиббса (ΔG), которая имеет две составляющие: изменение энтальпии (ΔH) и изменение энтропии (ΔS). Эти переменные связаны между собой уравнением: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$.
- Если ΔG реакции < 0 , такая реакция называется экзергонической и протекает до образования конечных продуктов; если $\Delta G > 0$, реакция называется эндергонической и протекает в обратном направлении. ΔG суммарного процесса есть сумма величин ΔG всех реакций.
- Превращение АТФ в P_i и АДФ или в PP_i и АМР — экзергонический процесс ($\Delta G \ll 0$), многие эндергонические реакции могут про-

текать благодаря сопряжению с этим высокоэкзергоническим процессом.

- Стандартное изменение свободной энергии реакции (ΔG°) — термодинамический параметр, связанный с константой равновесия: $\Delta G^\circ = -RT \ln K_{\text{eq}}$.
- Большинство экзергонических реакций в клетке протекают со значительными скоростями только благодаря катализу ферментами. Ферменты стабилизируют переходное состояние, снижают энергию активации ΔG^\ddagger и тем самым повышают скорость реакции на порядки величин. Каталитическая активность ферментов в клетке регулируется.
- Метаболизм представляет собой совокупность многочисленных взаимосвязанных реакций, в которых происходит последовательное превращение клеточных метаболитов. Каждая последовательность реакций регулируется таким образом, чтобы обеспечивать клетку всем необходимым в данный момент времени с наименьшими затратами энергии.

1.4. Генетические основы биохимии

Возможно, самым замечательным свойством живых клеток и организмов является их способность воспроизводить себе подобных в бесчисленных поколениях с почти идеальной точностью. Эта непрерывность передачи наследственных черт на протяжении миллионов лет предполагает постоянство структуры молекул, несущих генетическую информацию. Лишь немногие следы цивилизации, даже выгравированные на меди или вырезанные в камне (рис. 1-29), пережили более тысячи лет. Однако существуют доказательства того, что генетические инструкции, заложенные в живых организмах, остаются практически неизменными на протяжении несравнимо более длительного периода. Многие бактерии имеют ту же форму, размер и внутреннюю структуру и содержат те же виды простых молекул и ферментов, что и бактерии, жившие около четырех миллиардов лет назад. Эта общность структуры и состава — результат общности структуры генетического материала.

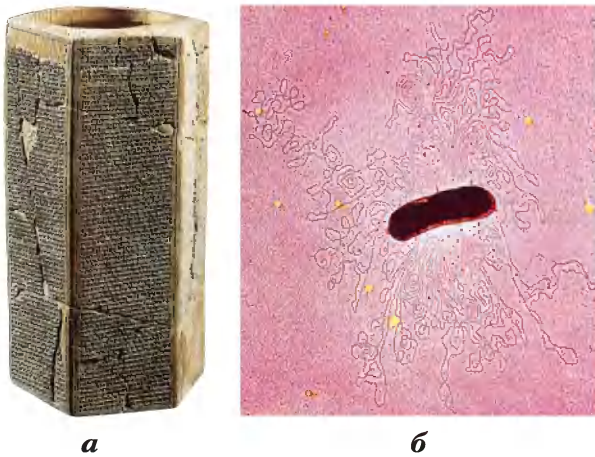


Рис. 1-29. Два древних манускрипта. а) Призма Сеннахериба, датированная VII в. до н. э. На призме на ассирийском языке изложены некоторые исторические события, происходившие во времена правления царя Сеннахериба. Призма содержит около 20 000 знаков, имеет вес около 50 кг и сохранилась почти в неизменном виде 2700 лет. б) Единственная молекула ДНК бактерии *E. coli*, вытекшая из ее поврежденной клетки. Длина этой молекулы ДНК в сотни раз превосходит саму клетку и содержит всю необходимую информацию, определяющую особенности клеточной структуры и функций. Бактериальная ДНК содержит около 4,6 млн знаков (нуклеотидов), весит менее 10^{-10} г и почти не подверглась изменениям за несколько миллионов лет. (Желтые пятна и черные точки на данной окрашенной электронной микрофотографии являются артефактами приготовления образца.)

К важнейшим открытиям биологии XX в. относится установление химической природы и трехмерной структуры генетического вещества — **дезоксирибонуклеиновой кислоты, ДНК**. Последовательность мономерных звеньев (нуклеотидов или, точнее, дезоксирибонуклеотидов) в этом линейном полимере кодирует инструкции, необходимые для синтеза всех других компонентов клетки, и служит матрицей для создания таких же молекул ДНК, передаваемых потомству при делении клетки. Непрерывность существования биологического вида требует сохранения его генетической информации в устойчивой форме, точной экспрессии и воспроизведения с минимальным количеством ошибок. Эффективное хранение, экспрессия и воспроизведение генетической информации определяют индивидуальность вида, его отличия от других и обеспечивают существование вида в последующих поколениях.

Генетическая информация (наследственность) заключена в молекулах ДНК

ДНК представляет собой длинную тонкую молекулу органического полимера. Это одна из редких молекул, которая в одном измерении (в ширину) имеет атомные размеры, а в другом измеряется по привычной человеку шкале (длина молекулы ДНК может достигать нескольких сантиметров). Человеческий сперматозоид или яйцеклетка, несущие наследственную информацию, накопленную за миллиарды лет эволюции, передают ее в виде молекул ДНК, в которых генетическая информация закодирована в линейной последовательности ковалентно связанных нуклеотидных звеньев.

Обычно когда мы описываем свойства химических веществ, мы имеем в виду усредненные характеристики огромного числа идентичных молекул. Трудно предсказать поведение одной-единственной молекулы из набора молекул, составляющего, скажем, 1 пмоль вещества ($\sim 6 \cdot 10^{11}$ молекул), зато *усредненные* характеристики вполне предсказуемы, поскольку при усреднении оперируют с большим числом молекул. Исключением является клеточная ДНК. Весь генетический материал *E. coli* заключен в *одной-единственной молекуле* ДНК, содержащей 4,64 млн нуклеотидов. Клетка *E. coli* должна дать идентичное потомство путем клеточного деления, и эта единственная молекула ДНК обязана воспроизвести себя с точностью до мельчайших деталей — здесь нет возможности для усреднений! Все вышесказанное справедливо для всех типов клеток. Человеческий сперматозоид приносит в оплодотворяемую им яйцеклетку всего лишь по одной молекуле ДНК в каждой из 23 различных хромосом, которые комбинируются лишь с одной молекулой ДНК в каждой соответствующей хромосоме яйцеклетки. Результат этого соединения абсолютно предсказуем — образуется зародыш со всеми его $\sim 25\,000$ генов, состоящих из 3 млрд нуклеотидов. Поразительный химический феномен!

Пример 1-1

ТОЧНОСТЬ РЕПЛИКАЦИИ ДНК

Какое количество раз на сегодняшний день реплицировалась ДНК бактерии *E. coli*, если самая первая клетка этого вида появилась 3,5 млрд лет

назад? Для простоты примите, что на протяжении этого времени деление клетки *E. coli* происходило один раз каждые 12 часов (это слишком большое время для современных бактерий, но, возможно, слишком малое для их древних предшественников).

Решение.

(1 деление/12 ч) (24 ч/сут.) (365 сут./год) $(3,5 \cdot 10^9 \text{ лет})$
 $= 2,6 \cdot 10^{12}$ поколений.

На одной странице данной книги содержится почти 5000 знаков, следовательно, во всей книге их около 5 млн. Хромосома *E. coli* также содержит около 5 млн знаков (пар оснований). Допустим, что вы переписываете эту книгу от руки, а затем вашу копию переписывает ваш одноклассник, затем его копию переписывает третий одноклассник и т. д. Насколько сильно каждая дальнейшая копия будет отличаться от оригинала? А теперь представьте себе учебник, который получился бы при переписывании книги 10^{12} раз!

Структура ДНК позволяет осуществлять репликацию и репарацию с почти абсолютной точностью

Способность живых клеток сохранять свой генетический материал и удваивать его для передачи следующему поколению является результатом комплементарности двух цепей, составляющих молекулу ДНК (рис. 1-30). ДНК представляет собой линейный полимер, построенный из четырех различных мономерных звеньев — **дезоксирибонуклеотидов**, организованных в строго определенной линейной последовательности. Именно в этой линейной последовательности закодирована генетическая информация. Две полимерные цепи закручены вокруг друг друга, образуя двойную спираль ДНК, в которой каждый дезоксирибонуклеотид одной нити образует специфическую пару с комплементарным дезоксирибонуклеотидом из другой нити. Перед тем как клетка начинает делиться, две нити ДНК расходятся, и каждая служит матрицей для синтеза новой комплементарной нити, в результате чего образуются две идентичные двуспиральные молекулы — по одной для каждой из двух дочерних

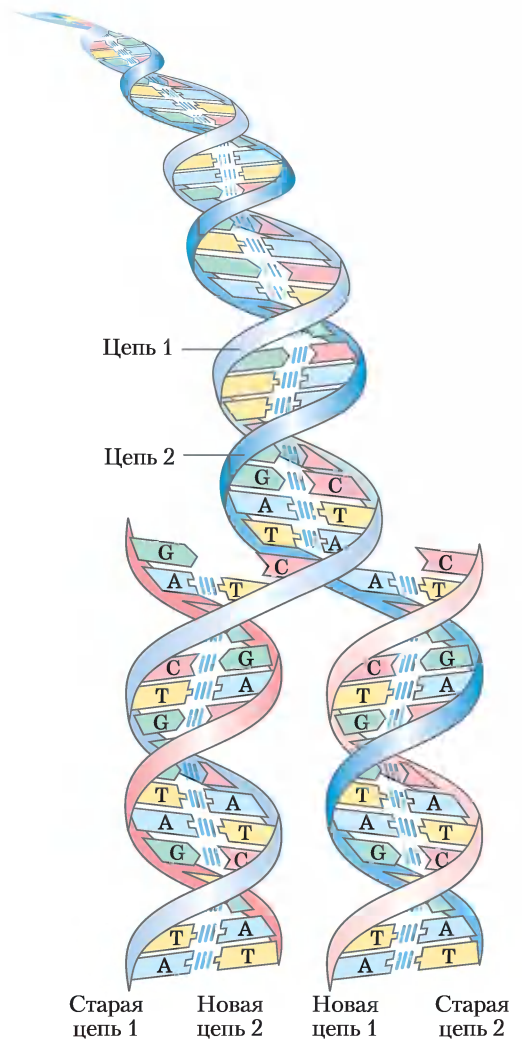


Рис. 1-30. Комплементарность двух цепей ДНК. ДНК — линейный полимер из соединенных ковалентной связью дезоксирибонуклеотидов четырех типов: дезоксиаденилата (A), дезоксигуанилата (G), дезоцитидилата (C) и дезоцитимидилата (T). Каждый нуклеотид имеет специфическую трехмерную структуру и способен специфически (нековалентно) связываться с одним нуклеотидом в комплементарной цепи: A всегда образует пару с T, а G — пару с C. Таким образом, в двухцепочечной молекуле ДНК полная последовательность нуклеотидов одной цепи комплементарна последовательности другой цепи. Две цепи (или нити) удерживаются вместе водородными связями (показаны вертикальными светло-синими черточками), между парами нуклеотидов. Кроме того, две цепи ДНК закручены вокруг друг друга, образуя двойную спираль. При репликации (удвоении) ДНК две нити (синие) спиральной молекулы расходятся, и синтезируются две новые (красные), каждая из которых комплементарна одной из исходных нитей. В результате образуются две двуспиральные молекулы ДНК, идентичные исходной молекуле.

клеток. Если одна нить повреждена, неизменность генетической информации обеспечивается наличием второй нити, служащей матрицей для *репарации* (восстановления) повреждения.

Линейная последовательность ДНК кодирует белки с трехмерной структурой

Информация в ДНК закодирована в виде линейной (одномерной) последовательности дезоксирибонуклеотидных звеньев, а вот экспрессия этой информации приводит к образованию трехмерных клеточных структур. Этот переход от одного к трем измерениям происходит в два этапа. Линейная последовательность дезоксирибонуклеотидов в ДНК кодирует (через промежуточную стадию образования РНК) белок с соответствующей линейной последовательностью аминокислот (рис. 1-31). Белок принимает определенную трехмерную форму, которая определяется его аминокислотной последовательностью и стабилизируется в первую очередь нековалентными взаимодействиями. Хотя окончательная форма свернутого белка диктуется его аминокислотной последовательностью, для процесса сборки (фолдинга) необходима помощь «молекулярных шаперонов» (см. рис. 4-29). Точная трехмерная структура белка, т. е. **нативная конформация**, является необходимым условием его нормального функционирования.

Белок в нативной конформации может образовывать нековалентные комплексы с другими макромолекулами (другими белками, нуклеиновыми кислотами или липидами), в результате чего возникают такие надмолекулярные структуры, как хромосомы, рибосомы и мембраны. Молекулы, входящие в состав этих комплексов, имеют специфические высокоаффинные участки для связывания других молекул этого комплекса, так что внутри клетки они могут спонтанно собираться в целые рабочие комплексы.

Сама белковая последовательность несет необходимую информацию для правильного свертывания и принятия нативной конформации, тем не менее успешное выполнение этой процедуры зависит от внутриклеточных условий — рН, ионной силы, концентрации ионов металлов и т. д. Таким образом, самой по себе последовательности ДНК недостаточно для образования клеточных структур.

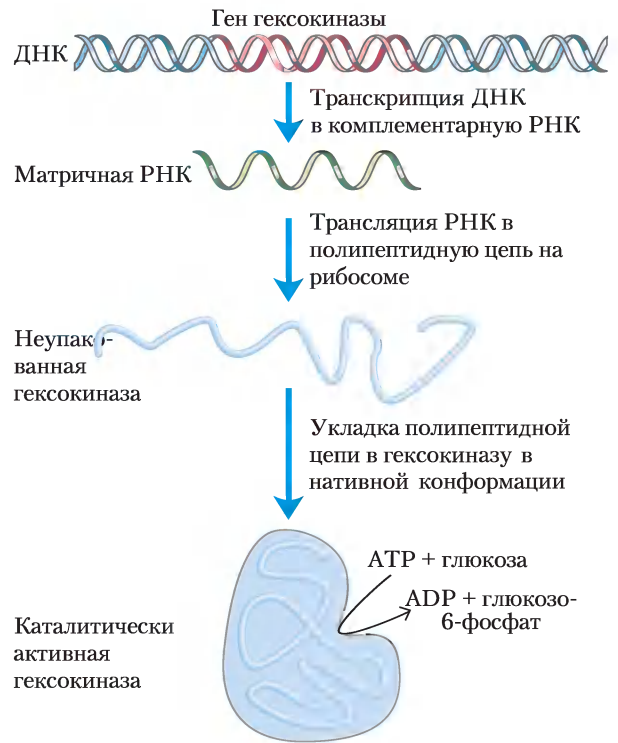


Рис. 1-31. От ДНК к РНК, от РНК к белку и далее к ферменту (на примере гексокиназы). Линейная последовательность дезоксирибонуклеотидов в ДНК, кодирующая фермент гексокиназу, сначала транскрибируется в комплементарную последовательность рибонуклеотидов (РНК). Далее последовательность РНК (матричная, или информационная, РНК) транслируется в линейную белковую цепь, которая принимает строго определенную пространственную структуру, вероятно, при участии молекулярных шаперонов. Принявшая нативную конформацию молекула гексокиназы обладает каталитической активностью: она катализирует фосфорилирование глюкозы, используя АТФ в качестве донора фосфорильной группы.

Краткое содержание раздела 1.4 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ БИОХИМИИ

- Генетическая информация закодирована в линейной последовательности четырех типов дезоксирибонуклеотидов в составе ДНК.
- Двойная спираль ДНК служит матрицей для собственной репликации и репарации.
- Линейная последовательность аминокислот в белке, закодированная в гене данного белка, определяет уникальную трехмерную структуру.

ру белка. Она также зависит от внутриклеточных условий.

- Некоторые макромолекулы с высоким сродством к другим макромолекулам способны самостоятельно образовывать надмолекулярные комплексы.

1.5. Эволюционные основы биохимии

Биологические явления обретают смысл, если их рассматривать через призму эволюции.

Феодосий Добжанский,
преподаватель биологии, март 1973

Огромный прогресс в биохимии и молекулярной биологии, произошедший в последние десятилетия, лишь подтвердил приведенное выше замечательное обобщение Добжанского. Удивительное сходство метаболических процессов и последовательностей генов у самых разных организмов строго доказывает, что все существующие сегодня организмы имеют общего эволюционного предшественника и произошли от него в результате ряда небольших изменений (мутаций), каждое из которых обеспечивало определенному организму преимущество в конкретной экологической нише.

Изменения наследственной информации создают возможность для эволюции

Несмотря на практически безукоризненную точность репликации, иногда в этом процессе случаются ошибки, приводящие к изменениям нуклеотидной последовательности ДНК, т. е. генетическим **мутациям** (рис. 1-32), изменяющим генетическую программу того или иного компонента клетки. Неверно исправленное повреждение одной из цепей ДНК приводит к такому же неправильному результату. Передаваемые по наследству мутации ДНК, т. е. мутации в репродуктивных клетках, могут оказаться для нового организма или клетки опасными или даже летальными. Например, такая мутация может привести к синтезу аномального фермента, который не способен катализировать важную метаболическую реакцию. Однако иногда возникают мутации, помогающие организмам или клеткам выживать в определенных условиях. Мутантный фермент, например,

может иметь несколько иную специфичность, позволяющую ему использовать субстрат, который клетка ранее не могла метаболизировать. Если популяция мутантных клеток окажется в условиях, когда этот субстрат является единственным или преобладающим, она получит преимущество перед остальными немутировавшими клетками (клетками **дикого типа**). Мутантная клетка и ее потомство выживут и будут процветать в таких новых условиях, а клетки дикого типа будут голодать и постепенно исчезнут. Этот феномен Дарвин назвал «выживанием наиболее приспособленного организма в условиях отбора», по сути это процесс природной селекции.

В результате ошибки при репликации хромосомы в нее может встраиваться вторая полная копия гена. Вторая копия является избыточной, и такие мутации не очень опасны. Это один из способов, позволяющий клеткам эволюционировать: возникает новый ген с новыми функциями при сохранении исходного гена с прежними (обычными) функциями. С этой точки зрения молекулы ДНК современных организмов являются историческими документами, запечатлевшими долгий путь от самых первых клеток к сегодняшним видам. Однако исторический «отчет» ДНК неполный: в ходе эволюции многие мутации должны были исчезнуть. Но тем не менее молекулы ДНК являются лучшим документом истории биологии, имеющимся в нашем распоряжении. Частота ошибок при репликации ДНК не может быть слишком высокой, поскольку это привело бы к нежизнеспособности следующего поколения клеток, но не может быть и слишком низкой, поскольку тогда исключается возможность генетической изменчивости, позволяющей выжившим мутантам приспособляться к новым условиям обитания.

Несколько миллиардов лет адаптивного отбора научили клетки извлекать максимум выгоды из химических и физических свойств молекул потребляемых веществ. Удачные генетические изменения в отдельных организмах популяции в сочетании с естественным отбором (выживанием и воспроизведением организмов, наилучшим образом приспособившихся к изменившимся условиям обитания) привели к возникновению огромного разнообразия современных организмов, каждый из которых адаптирован к существованию в определенной экологической нише.

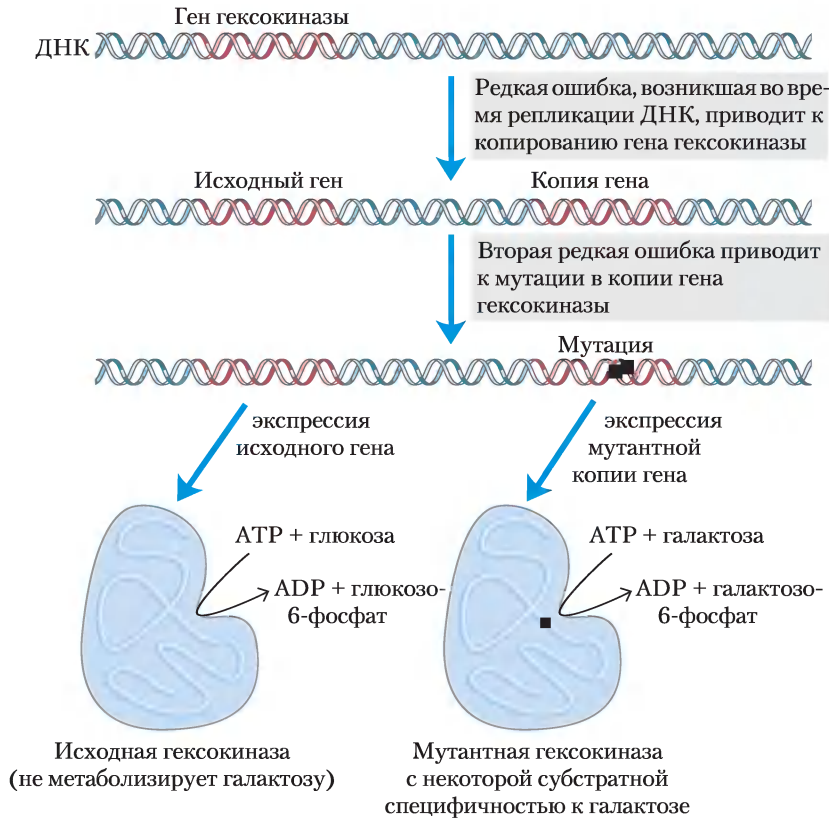


Рис. 1-32. Репликация ДНК и мутации: возможный путь появления новой ферментативной активности. В данном примере рассматривается возможность случайного события, когда ген гексокиназы в гипотетическом организме при репликации ДНК копируется дважды. В результате такой организм несет в себе две полные копии гена гексокиназы, одна из которых не нужна. В ходе множества клеточных делений ДНК двух генов гексокиназы продолжает реплицироваться, причем в этом процессе возможны редкие случайные ошибки, приводящие к изменениям последовательности одной копии и кодируемого ею белка. Очень редкое, но возможное событие: измененный белок получает способность связываться с новым субстратом (галактоза в нашем гипотетическом случае). Несущая такой мутантный ген клетка теперь обладает способностью метаболизировать галактозу, что позволит ей выжить в тех условиях, когда глюкозы в среде нет, но есть галактоза. Если бы репликация гена не предшествовала его мутации, была бы утеряна исходная функция данного белка (метаболизм глюкозы).

Биомолекулы возникли в процессе химической эволюции

Итак, мы познакомились с первой «главой» истории эволюции — возникновением первых живых клеток. Органические вещества, в том числе основные биомолекулы типа аминокислот и углеводов, из которых состоят живые организмы, обнаруживаются в земной коре, океанах и в атмосфере лишь в следовых количествах. Каким же образом у первых живых организмов возникли столь характерные органические соединения, используемые в качестве строительных блоков в биополимерах?

В соответствии с одной из гипотез эти соединения возникли в результате мощных атмосферных воздействий (ультрафиолетового излучения, вспышек молнии или вулканических извержений) на газы в пребиотической атмосфере Земли и на неорганические вещества в горячих источниках в глубинах океана.

Классический опыт, иллюстрирующий абиотическое (небиологическое) происхождение органических биомолекул, был осуществлен в 1953 г. Стенли Миллером в лаборатории Гарольда Юри. Миллер на протяжении недели или

более пропускал электрические разряды, имитировавшие молнию, через смесь газов, подобную существовавшей на Земле в ранний период перед зарождением жизни (метан, аммиак, водяные пары и водород) между двумя электродами (рис. 1-33). При анализе газовой фазы из реакционного сосуда были обнаружены оксид и диоксид углерода, а также исходные вещества. Водная фаза содержала разнообразные органические соединения, в том числе некоторые аминокислоты, гидроксикислоты, альдегиды и циановодород HCN. Этот эксперимент доказал возможность абиотического пути образования биомолекул в относительно мягких условиях за сравнительно короткий срок.

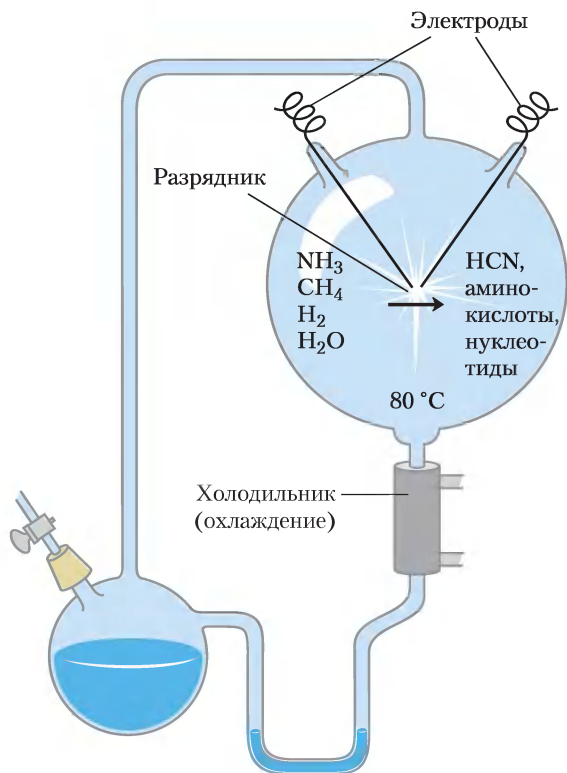


Рис. 1-33. Абиотический синтез биомолекул. Искро-разрядный аппарат, использовавшийся Миллером и Юри, в экспериментах по демонстрации абиотического образования органических веществ в условиях примитивной атмосферы. Через смесь газов в сосуде пропускали электрические разряды, после конденсации продукты реакции анализировали. Среди продуктов были обнаружены различные биомолекулы, в том числе и аминокислоты.

В более сложных лабораторных экспериментах были получены доказательства того, что в этих условиях могут также образовываться многие химические составляющие живых клеток, в том числе полипептиды и РНК-подобные молекулы. Полимерные цепочки РНК могут проявлять каталитические свойства в важных биологических реакциях (см. гл. 26 и 27). РНК, вероятно, сыграла важнейшую роль в пребиотической эволюции как в качестве катализатора, так и источника информации.

РНК и схожие с ней предшественники могли быть первыми генами и катализаторами

В существующих сегодня организмах нуклеиновые кислоты кодируют генетическую информацию, определяющую структуру ферментов, а ферменты катализируют репликацию и репарацию нуклеиновых кислот. Взаимозависимость этих двух классов соединений ставит перед наукой трудный вопрос: что было раньше — ДНК или белок?

Однако, может быть, они появились одновременно и им обоим предшествовала РНК. Открытие того факта, что молекулы РНК способны катализировать собственный синтез, указывает на возможную роль РНК или подобных молекул в качестве первых генов и первых катализаторов. По этому сценарию (рис. 1-34) на одной из ранних стадий биологической эволюции в «первичном бульоне» возникла молекула РНК, которая смогла катализировать синтез других молекул РНК с той же последовательностью, т. е. образовалась самореплицирующаяся молекула РНК. Концентрация молекул РНК должна была возрастать экспоненциально, поскольку из одной молекулы получается две, из двух — четыре и т. д. Точность саморепликации, вероятно, была неабсолютной, поэтому стали появляться варианты РНК и некоторые из них оказались еще лучше приспособлены к саморепликации. В конкурентной борьбе за нуклеотиды победили наиболее эффективные молекулы, а менее эффективные исчезли.

Согласно гипотезе «мира РНК», разделение функций между ДНК (хранение генетической информации) и белком (катализ) произошло позднее. Возникали новые варианты самореплицирующихся РНК, которые были способны так-

же катализировать конденсацию аминокислотных звеньев в полипептидные цепи. В какой-то момент образовавшиеся таким образом пептиды стали усиливать способность РНК к саморепликации. Такая пара РНК/пептид-помощник могла претерпевать дальнейшие изменения, создавая еще более эффективные системы репликации. Замечательное открытие того факта, что в аппарате для синтеза белка современной клетки (рибосоме) не белок, а РНК катализирует образование пептидной связи, свидетельствует в пользу гипотезы «мира РНК».

Через какое-то время после возникновения этих примитивных систем белкового синтеза произошло следующее изменение: функцию

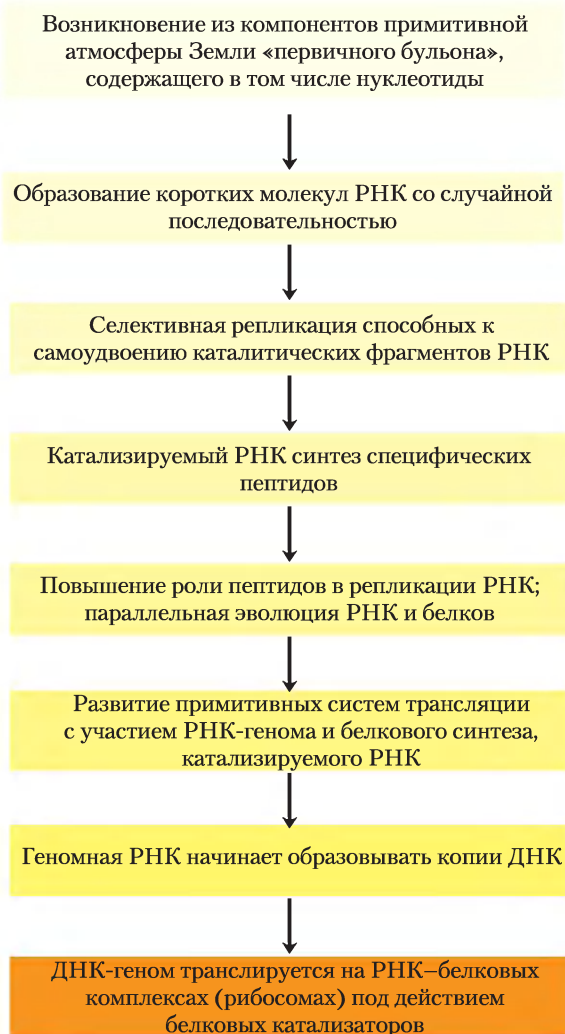


Рис. 1-34. Возможный сценарий развития «мира РНК».

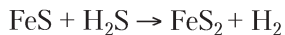
сохранения «генетической» информации взяла на себя молекула ДНК, последовательность которой комплементарна последовательности самореплицирующейся РНК. Молекулы РНК, в свою очередь, эволюционировали, совершенствуя катализ синтеза белка. (Далее в гл. 8 мы остановимся на том, почему молекула ДНК более стабильна по сравнению с РНК и лучше подходит для хранения наследственной информации.) Белки проявили себя в качестве универсальных катализаторов и позднее взяли на себя эту функцию. Липидоподобные компоненты из «первичного бульона» образовали относительно непроницаемые слои, окружавшие самореплицирующиеся ассоциации молекул. Высокая концентрация белков и нуклеиновых кислот внутри этих липидных оболочек способствовала молекулярным взаимодействиям, необходимым для репликации.

Биологическая эволюция началась более трех с половиной миллиардов лет назад

Земля возникла около 4,6 млрд лет назад, а первые живые организмы появились более 3,5 млрд лет назад. В 1996 г. ученые обнаружили в Гренландии не окаменевшие останки, а «химические» доказательства жизни («топливные молекулы»), возраст которых свыше 3,85 млрд лет. Они нашли вросшие в камень углеродсодержащие вещества, вероятно, биологического происхождения. В первый миллиард лет существования Земли кое-где стали появляться первые простые организмы, способные воспроизводить свою собственную структуру на основании матрицы (РНК?), служившей первым генетическим материалом. Поскольку атмосфера Земли в те времена была практически лишена кислорода, и лишь немногие микроорганизмы использовали органическое вещество, образовавшееся в естественных процессах, существовавшие органические соединения были относительно устойчивыми. С учетом этой устойчивости органических соединений и огромной длительности происходивших процессов, можно только предполагать, как невероятное стало неизбежным: органические вещества включались в развивающиеся клетки, эффективность механизмов самовоспроизведения возрастала. Начался процесс биологической эволюции.

Первые клетки, вероятно, были хемогетеротрофами

Самые первые клетки возникали в восстановительной атмосфере (где нет кислорода) и, вероятно, получали энергию из неорганических веществ, таких как сульфид железа (II) и карбонат железа (II), которые тогда на Земле имелись в больших количествах. Например, в реакции



выделяется достаточное количество энергии, чтобы обеспечить синтез молекулы АТФ или аналогичного вещества. Необходимые клеткам органические вещества могли появиться из компонентов ранней атмосферы Земли (CO , CO_2 , N_2 , NH_3 , CH_4 и др.) в результате небиологических воздействий, таких как вспышки молнии и вулканические извержения, или в гидротермальных процессах. Существует также гипотеза, что органические вещества были привнесены на Землю из космоса. В 2006 г. космический зонд Stardust вернулся на Землю с частицами космической пыли из хвоста кометы, и в этой пыли были обнаружены различные органические вещества.

Первые одноклеточные организмы, возникшие из смеси органических веществ в «первичном бульоне», практически наверняка были хемогетеротрофами (рис. 1-5). Необходимые им органические вещества исходно возникли из компонентов первичной атмосферы (CO , CO_2 , N_2 , CH_4 и др.) не биологическим путем, а под действием тепла от вулканической деятельности и разрядов молний. Первые гетеротрофы постепенно приобретали способность добывать энергию из окружающих веществ, использовали ее для синтеза необходимых им молекул и становились менее зависимыми от внешних источников питания. Очень важным шагом в эволюции было появление пигментов, способных усваивать энергию Солнца, с помощью которой клетки могли восстанавливать («фиксировать») CO_2 , превращая его в более сложные органические вещества. Первым донором электронов для этого процесса **фотосинтеза**, по-видимому, был H_2S , превращавшийся в элементную серу или сульфат-ионы (SO_4^{2-}). Позднее клетки стали использовать в качестве донора электронов воду, в результате чего в ат-

мосферу стал поступать кислород. Потомками тех первых фотосинтезирующих организмов, продуцирующих кислород, являются современные цианобактерии.

Поскольку в ранние периоды существования Земли атмосфера почти не содержала кислорода, первые клетки были анаэробами. В таких условиях хемотрофы могли окислять органические вещества до CO_2 , передавая электроны не на кислород, а на такие акцепторы, как SO_4^{2-} , в результате чего в качестве побочного продукта образовывался H_2S . С появлением продуцирующих кислород фотосинтезирующих бактерий атмосфера все более обогащалась кислородом — мощным окислителем и смертельным ядом для анаэробов. В этих сложных условиях, которые Линн Маргеллис и Дорион Саган назвали «кислородным холокостом», некоторые линии микроорганизмов дали начало аэробам, получавшим энергию в процессе передачи электронов от топливных молекул кислороду. Поскольку такие реакции сопровождаются высвобождением значительного количества энергии, в аэробных условиях использующие кислород организмы получили энергетическое преимущество над анаэробными собратьями. В результате в кислородсодержащей атмосфере стали преобладать аэробные организмы.

Современные бактерии населяют практически все экологические ниши в биосфере; существуют организмы, способные использовать в качестве источника углерода и энергии практически любые органические вещества. Фотосинтезирующие микробы в пресной и в соленой воде поглощают солнечную энергию и используют ее для образования углеводов и других клеточных компонентов, которые, в свою очередь, служат источником питания для других живых организмов. Процесс эволюции продолжается. На примере быстро воспроизводящихся бактериальных клеток мы можем увидеть этот процесс в лабораторных условиях. Один из подходов к получению примитивной клетки («протоклетки») в лабораторных условиях состоит в том, чтобы определить минимальное количество необходимых для жизни генов, анализируя геномы самых просто устроенных бактерий. Минимальным геномом среди свободноживущих бактерий обладает *Mycobacterium genitalium*: он состоит из 580 000 пар нуклеотидов и содержит 483 гена.

Эукариотические клетки возникли в несколько стадий из более простых предшественников

Судя по ископаемым остаткам, около 1,5 млрд лет назад начали возникать более крупные и сложные организмы, возможно, это были первые эукариотические клетки (рис. 1-35). Детали эволюционного пути от доядерных к ядерным клеткам невозможно восстановить только на основании ископаемых остатков, однако морфологическое и биохимическое изучение современных организмов позволило приблизительно представить последовательность событий, согласующихся с результатами анализа ископаемых остатков.

Обязательно должны были произойти три принципиальных изменения. Во-первых, по-



Рис. 1-35. Этапы эволюции жизни на Земле.

скольку клетка обзаводилась все большим количеством ДНК, нужны были более сложные механизмы для осуществления компактной упаковки ДНК в комплексах со специфическими белками, а также для точного разделения между дочерними клетками в процессе деления. Для этого понадобились специализированные белки, стабилизирующие свернутую ДНК и разрушающие комплексы ДНК с белком (хромосомы) при делении клетки. Во-вторых, при увеличении размера клетки стала развиваться система внутренних мембран, в том числе появилась двойная мембрана, окружающая ДНК. Эта мембрана отделяла синтез РНК на основе ДНК-матрицы, протекающий в ядре, от синтеза белка на рибосомах в цитоплазме. Наконец, в-третьих, ранние эукариотические клетки, которые не могли осуществлять фотосинтез или аэробный метаболизм, включали в себя аэробные или фотосинтезирующие бактерии – появились **эндосимбиотические** ассоциации, со временем ставшие постоянными (рис. 1-36). Некоторые аэробные бактерии превратились в митохондрии современных эукариот, а некоторые фотосинтезирующие цианобактерии стали пластидами, как, например, хлоропласты в зеленых водорослях – вероятных предшественниках клеток современных растений.

На более поздних этапах эволюции одноклеточные организмы стали образовывать кластеры, что позволило им увеличить подвижность, повысить эффективность метаболизма или репродукции по сравнению со свободноживущими одиночными клетками. Дальнейшая эволюция таких кластеров привела к возникновению устойчивых ассоциаций отдельных клеток и постепенному развитию специализации внутри колоний – произошла *дифференцировка* клеток.

Использование преимуществ клеточной специализации привело к возникновению еще более крупных и высокодифференцированных организмов, в которых одни клетки осуществляли сенсорные функции, другие – пищеварительные, фотосинтетические, репродуктивные и т. д. Современные многоклеточные организмы содержат сотни типов клеток, специализирующихся на определенной функции, обслуживающих весь организм. Основные механизмы, возникшие еще на заре эволюции, далее раз-

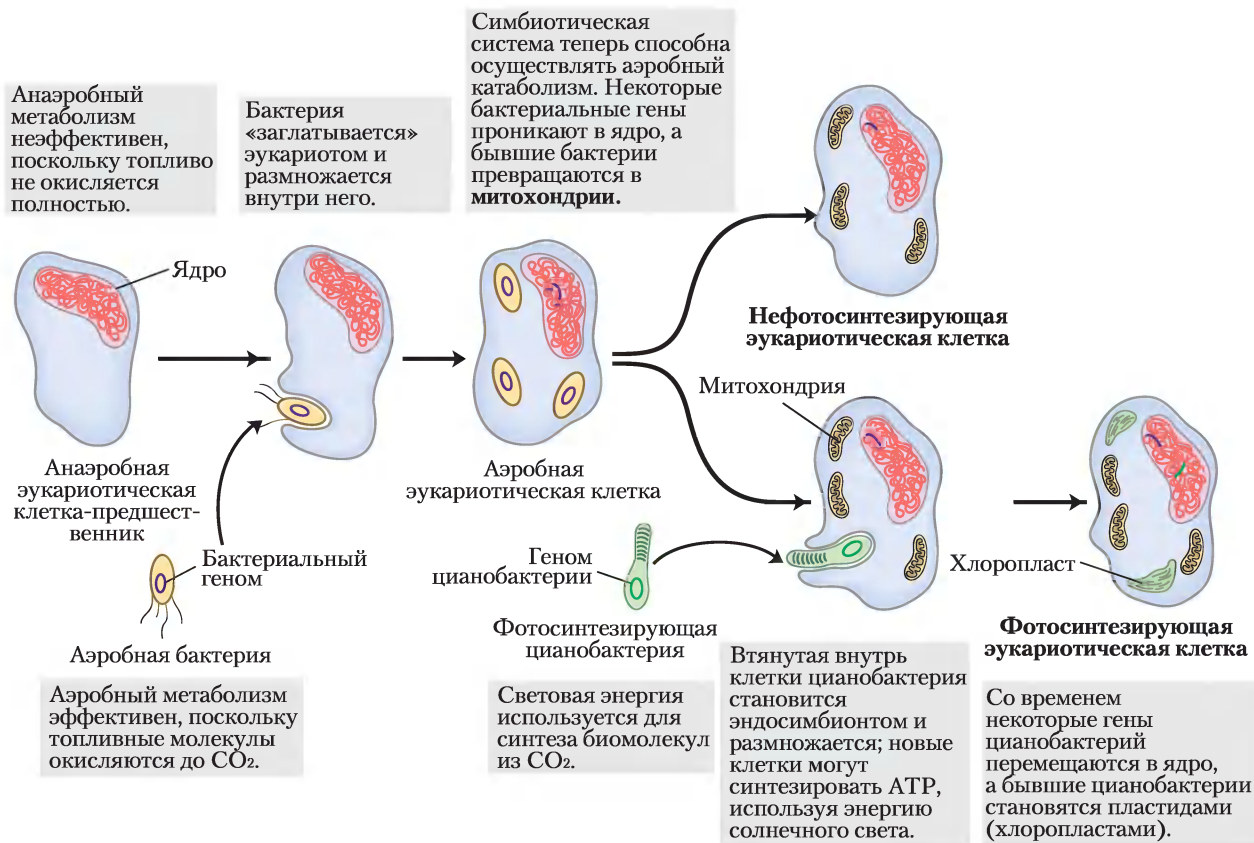


Рис. 1-36. Роль эндосимбиоза в эволюции эукариот. Самые первые эукариоты были анаэробами. Они включили внутрь себя пурпурные бактерии (показаны желтым цветом), которые придали им способность осуществлять аэробный катаболизм и со временем превратились в митохондрии. Фотосинтезирующие цианобактерии (показаны зеленым цветом) впоследствии стали эндосимбионтами некоторых аэробных эукариот, превратив эти клетки в фотосинтезирующих предшественников современных зеленых водорослей и растений.

вивались и оттачивались. В основе пульсирующих движений ресничек парамеции и жгутиков хламидомонады лежат те же самые ключевые структуры и механизмы, что используются, например, высокоспециализированными клетками сперматозоидов позвоночных.

Молекулярное строение раскрывает эволюционные связи

Сегодня в распоряжении биохимиков огромная и все время пополняющаяся кладовая знаний о молекулярном строении клеток. Накопленные знания можно использовать для анализа эволюционных связей и усовершенствования эволюционной теории.

Последовательность **генома** (всего генетического «багажа» организма) полностью определена уже для сотен бактерий, более 40 архей, постоянно увеличивающегося числа эукариотических микроорганизмов (например, *Saccharomyces cerevisiae* и *Plasmodium* sp.), растений, включая *Arabidopsis thaliana* и рис, многоклеточных животных, включая *Caenorhabditis elegans* (круглый червь), *Drosophila melanogaster* (фруктовая мушка), мышь, крысу, собаку, шимпанзе и *Homo sapiens* (табл. 1-2). Этот список постоянно пополняется. Зная последовательности геномов, можно проводить детальное сравнение различных видов и глубже понять эволюционный процесс. До настоящего времени молекулярная систематика, основанная на

Таблица 1–2 Некоторые организмы, для которых определены полные нуклеотидные последовательности

Организм	Размер генома (млн пар нуклеотидов)	Число генов	Биологические особенности
<i>Mycoplasma genitalium</i>	$5,8 \cdot 10^5$	$4,8 \cdot 10^2$	Вызывает пневмонию
<i>Treponema pallidum</i>	$1,1 \cdot 10^6$	$1,0 \cdot 10^3$	Вызывает сифилис
<i>Borrelia burgdorferi</i>	$9,1 \cdot 10^5$	$8,5 \cdot 10^2$	Вызывает болезнь Лайма
<i>Helicobacter pylori</i>	$1,7 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^3$	Вызывает язву желудка
<i>Methanococcus jannaschii</i>	$1,7 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^3$	Растет при 85 °С!
<i>Haemophilus influenzae</i>	$1,8 \cdot 10^6$	$1,6 \cdot 10^3$	Вызывает грипп
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	$2,2 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^3$	Относится к царству архей, метаноген
<i>Synechocystis</i> sp.	$3,6 \cdot 10^6$	$3,2 \cdot 10^3$	Цианобактерия
<i>Bacillus subtilis</i>	$4,2 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^3$	Распространенная почвенная бактерия
<i>Escherichia coli</i>	$4,6 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^3$	Некоторые штаммы вызывают токсический шок
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,2 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^3$	Одноклеточный эукариотический организм
<i>Plasmodium falciparum</i>	$2,3 \cdot 10^7$	$5,3 \cdot 10^3$	Вызывает малярию у человека
<i>Caenorhabditis elegans</i>	$1,0 \cdot 10^8$	$2,3 \cdot 10^4$	Многоклеточный круглый червь
<i>Anopheles gambiae</i>	$2,3 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^4$	Переносчик малярии
<i>Arabidopsis thaliana</i>	$1,2 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^4$	Сорное растение
<i>Oryza sativa</i>	$3,9 \cdot 10^8$	$3,8 \cdot 10^4$	Посевной рис
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,2 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^4$	Фруктовая мушка
<i>Mus musculus domesticus</i>	$2,6 \cdot 10^9$	$2,7 \cdot 10^4$	Лабораторная мышь
<i>Pan troglodytes</i>	$3,1 \cdot 10^9$	$4,9 \cdot 10^4$	Шимпанзе
<i>Homo sapiens</i>	$3,1 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^4$	Человек

Источник: страница RefSeq для каждого организма на www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes

последовательностях генов, согласовывалась с классической систематикой, основанной на изучении макроскопических структур, но во многом была более точной. Хотя на уровне анатомии постоянно происходило расхождение организмов, основополагающее единство живого становится очевидным при проведении исследований на молекулярном уровне. В самых простых и самых сложных организмах молекулярные структуры и механизмы обладают замечательным сходством. Эти сходства легче всего проследить на уровне последовательностей либо ДНК, кодирующих белки, либо самих белков.

Если последовательности двух генов (нуклеотидные последовательности ДНК или последовательности кодируемых ими белков) имеют очевидное сходство, их называют гомологичными, а кодируемые ими белки — **гомологами**. Если два гомологичных гена обнаружены у одного и того же вида, их называют паралогичными, а кодируемые ими белковые продук-

ты — **паралогами**. Считается, что паралогичные гены образовались путем удвоения гена и постепенных изменений последовательностей обеих копий. Обычно паралогичные белки имеют не только схожие аминокислотные последовательности, но и аналогичную трехмерную структуру, хотя в ходе эволюции стали выполнять различные функции.

Два гомологичных гена (или белка) из организмов *разных* видов называют ортологичными, а их белковые продукты — **ортологами**. Ортологи в обоих организмах обычно выполняют одну и ту же функцию. Поэтому, когда выясняется, что вновь секвенированный ген в организме одного вида ортологичен гену из организма другого вида, можно предположить, что они кодируют белки с одинаковыми функциями. Так, без проведения биохимических исследований на основании геномных последовательностей можно определить функции белковых продуктов. **Аннотированный геном** кроме самой последовательности ДНК

содержит описание предполагаемой функции продукта каждого гена, выведенной на основании сравнения данной геномной последовательности с последовательностями из других организмов, в которых функции белков известны. В принципе, определяя метаболические пути (наборы ферментов), кодируемые данным геномом, можно вывести метаболические характеристики организма на основании одной только геномной последовательности.

Различия в последовательностях гомологичных генов можно рассматривать как грубый способ оценки степени расхождения двух видов в процессе эволюции, т. е. эти различия позволяют оценить, как давно общий предшественник дал начало двум эволюционным линиям. Чем больше различий, тем раньше произошло расхождение. Можно построить филогенетическое (фамильное) древо, на котором эволюционная дистанция между двумя любыми видами определяется близостью их расположения (например, рис. 1-4).


В ходе эволюции появляются новые структуры, процессы и регуляторные механизмы, что отражает изменения в геномах эволюционирующих организмов. В геноме такого простого эукариотического организма, как дрожжи, должны были появиться отсутствующие у бактерий и архей гены, отвечающие за образование ядерной мембраны. Геном насекомых должен содержать отсутствующие у дрожжей гены белков, определяющие специфическую сегментированную структуру тела насекомых. Геномы всех позвоночных должны содержать гены, несущие информацию о развитии позвоночника, а геномы млекопитающих — уникальные гены, отвечающие за образование плаценты, существующей только у млекопитающих, и т. д. Сравнение целых геномов организмов каждого типа приводит к выявлению генов, имеющих принципиальное значение для фундаментальных эволюционных изменений в структуре и развитии организма.

Функциональная геномика указывает назначение генов в специфических клеточных процессах

После определения полной нуклеотидной последовательности генома и аннотирования каждого гена (т. е. приписывания каждому гену определенной функции) молекулярный генетик может

сгруппировать гены в соответствии с теми процессами, в которых они участвуют (синтез ДНК или белка, образование АТФ и др.). Таким образом удастся определить, какая часть генома отвечает за ту или иную активность клетки. Функции многих генов (более 40%) в клетках *E. coli*, *A. thaliana* и *H. sapiens* до сих пор неизвестны. У всех трех видов значительную часть генома составляют гены транспортных белков, отвечающих за перемещение ионов и небольших молекул через плазматическую мембрану (их все же больше у бактерий и растений, чем у млекопитающих: 10% из ~4 400 генов у *E. coli*, ~8% из ~32 000 генов у *A. thaliana* и ~4% из ~29 000 генов у *H. sapiens*). Гены, кодирующие белки и РНК для их синтеза, составляют 3–4% генома *E. coli*. В более сложно устроенных клетках *A. thaliana* больше генов требуется для доставки белков к местам их основной локализации, чем для синтеза самих этих белков (соответственно 6 и 2% генома). В общем, чем сложнее организм, тем большую часть его генома составляют гены, *регулирующие* клеточные процессы, и меньшая часть отвечает за реализацию основных процессов типа образования АТФ и синтеза белка.

Сравнительный анализ геномов играет все большую роль в биологии человека и медицине

 Геномы человека и шимпанзе совпадают на 99,9%, но разница между двумя видами огромна. Эти небольшие различия в геномах должны объяснить человеческую способность говорить, чрезвычайную развитость мышц шимпанзе и массу других вещей. Сравнение геномов позволит исследователям идентифицировать гены, которые могут быть связаны с расхождением в программах развития человека и других приматов и с появлением у человека более сложных функций, в том числе языка общения. Картина станет проясняться только по мере того, как будет проведено сравнение генома человека с геномными последовательностями многих приматов.

В то же время генетические различия между людьми чрезвычайно ничтожны по сравнению с различиями между человеком и шимпанзе, тем не менее все мы очень разные, в том числе это касается здоровья и предрасположенности к хроническим заболеваниям. Еще очень многое

предстоит узнать о различиях в геномных последовательностях людей, но со всей определенностью можно предсказать, что в ближайшие десятилетия доступность генетической информации принципиально изменит систему медицинской диагностики и лечения. Можно ожидать, что паллиативное лечение некоторых генетических заболеваний сменится реальной помощью, а болезни, предрасположенность к которым связана с наличием определенных генетических маркеров, можно будет предупреждать усиленными превентивными мерами. Сегодняшняя «история болезни», возможно, сменится медицинским «прогнозом». ■

Краткое содержание раздела 1.5 ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ОСНОВЫ БИОХИМИИ

■ Наследуемые случайные мутации приводили к появлению организмов, лучше приспособленных к выживанию в определенных экологических нишах; такое потомство выдержало естественный отбор. Этот процесс мутаций и отбора лежит в основе дарвиновской теории эволюции, указавшей на происхождение всех живущих ныне организмов от первой клетки и объяснившей фундаментальное сходство всех живых организмов.

■ Жизнь возникла около 3,5 млрд лет назад, наиболее вероятно, с появлением заключенной в мембрану самореплицирующейся молекулы РНК. Составляющие первой клетки могли возникнуть вблизи горячих источников в глубинах океана, в результате действия молнии или высокой температуры на такие простые молекулы, как CO_2 и NH_3 .

■ Каталитическая и генетическая функции РНК первых геномов со временем были переданы белкам и ДНК.

■ В результате эндосимбиоза с бактериями эукариотические клетки приобрели способность к фотосинтезу и окислительному фосфорилированию. Возникли многоклеточные организмы с дифференцировкой клеток, в результате которой различные типы клеток специализируются на выполнении одной или

нескольких функций, важных для жизнедеятельности всего организма.

■ Знание полных нуклеотидных последовательностей организмов, находящихся на разных ветвях филогенетического древа, способствует пониманию эволюционного процесса и открывает широчайшие возможности для развития медицины.

Ключевые термины

Все термины объясняются в глоссарии.

Анаболизм 27	Прокариоты 18
Археи 19	Равновесие 46
Бактерии 19	Стереоизомеры 33
Геном 18	Хиральный центр 36
Изменение свободной энергии Гиббса (ΔG) 46	Цитоскелет 24
Изменение стандартной свободной энергии (ΔG°) 47	Экзергоническая реакция 45
Катаболизм 27	Эндергоническая реакция 45
Конфигурация 33	Энергия активации (ΔG^\ddagger) 48
Конформация 38	Энтальпия (H) 44
Метаболит 18	Энтропия (S) 44
Мутация 54	Эукариоты 18
	Ядро 18

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общие сведения

Friedman, H.C. (2004) From “*Butyrifacterium*” to “*E. coli*”: an essay on unity in biochemistry. *Perspect. Biol. Med.* 47, 47–66.

Fruton, J.S. (1999) *Proteins, Enzymes, Genes: The Interplay of Chemistry and Biochemistry*, Yale University Press, New Haven.

Выдающийся историк биохимии прослеживает развитие этой науки и обсуждает ее вклад в медицину, фармацевтику и сельское хозяйство.

Harold, F.M. (2001) *The way of the Cell: Molecules, Organisms, and the Order of Life*, Oxford University Press, Oxford.

Judson, H.F. (1996) *The Eighth Day of Creation: The Makers of the Revolution in Biology*, expanded edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Хорошее и авторитетное изложение истории развития биохимии и молекулярной биологии в XX в.

Kornberg, A. (1987) The two cultures: chemistry and biology. *Biochemistry* **26**, 6888–6891.

О важной роли химических методов анализа в решении биологических задач в изложении знаменитого практика.

Monod, J. (1971) *Chance and Necessity*, Alfred A. Knopf, Inc., New York.

Впервые вышла в 1970 г. под названием *Le hasard et la necessite*, Editions du Seuil, Paris. О философских последствиях развития биологии.

Morowitz, H.J. (2002) *The Emergence of Everything (How the World Became Complex)*, Oxford University Press, Oxford.

Краткое, прекрасно написанное рассуждение о появлении сложных организмов из более простых.

Pace, N.R. (2001) The universal nature of biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 805–808.

Как дать минимальное определение жизни на Земле и в других местах.

Принципы организации клетки

Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., & Hardin, J. (2000) *The World of the Cell*, 5th edn, The Benjamin Cummings Publishing Company, Redwood City, CA.

Прекрасный вводный курс клеточной биологии.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.R., Zipursky, S.L., & Darnell, J. (2003) *Molecular Cell Biology*, 5th edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Подобно книге Альбертса с соавторами, данная книга также может служить прекрасным подспорьем в изучении этой и последующих глав настоящей книги.

Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H., & Heller, H.C. (2001) *Life: The Science of Biology*, 6th edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Химические основы биохимии

Barta, N.S. & Stille, J.R. (1994) Grasping the concepts of stereochemistry. *J. Chem. Educ.* **71**, 20–23.

Понятное описание R/S-номенклатуры стереоизомеров; приведены практические советы по определению и запоминанию типа изомера.

Vollhardt, K.P.C. & Shore, N.E. (2002) *Organic Chemistry: Structure and Function*, W.H. Freeman and Company, New York.

Современное изложение стереохимии, функциональных групп, реакционной способности и химии основных классов биомолекул.

Физические основы биохимии

Atkins, P.W. & de Paula, J. (2001) *Physical Chemistry*, 7th edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Atkins, P.W. & Jones, L. (1999) *Chemical Principles: The Quest for Insight*, W.H. Freeman and Company, New York.

Blum, H.F. (1968) *Time's Arrow and Evolution*, 3rd edn, Princeton University Press, Princeton.

Замечательное обсуждение влияния второго начала термодинамики на биологическую эволюцию.

Генетические основы биохимии

Griffiths, A.J.F., Gelbart, W.M., Lewinton, R.C., & Miller, J.H. (2002) *Modern Genetic Analysis: Integrating Genes and Genomes*, W.H. Freeman and Company, New York.

Hartwell, L., Hood, L., Goldberg, M.L., Silver, L.M., Veres, R.C., & Reynolds, A. (2003) *Genetics: From Genes to Genomes*, McGraw-Hill, New York.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.

Jacob, F. (1973) *The Logic of Life: A History of Heredity*, Pantheon Books, Inc., New York.

Впервые вышла в 1970 г. под названием *La logique du vivant: une histoire de l'heredite*, Editions Gallimard, Paris. Увлекательный исторический и философский анализ того пути, по которому мы шли к теперешнему пониманию молекулярных основ жизни.

Klug, W.S. & Cummings, M.R. (2002) *Concepts of Genetics*, 7th edn, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Pierce, B. (2002) *Genetics: A Conceptual Approach*, W.H. Freeman and Company, New York.

Эволюционные основы биохимии

Brow, J.R. & Doolittle, W.F. (1997) Archea and the prokaryote-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 456–502.

Очень подробное обсуждение аргументов в пользу расположения архей на филогенетической ветви, ведущей к многоклеточным организмам.

Carroll, S.B. (2006) *The Making of the Fittest: DNA and the Ultimate Forensic Record of Evolution*, W.W. Norton & Company, Inc., New York.

Carroll, S.B. (2005) *Endless Forms Most Beautiful: The New Science of Evo Devo and the Making of the Animal Kingdom*, W.W. Norton & Company, Inc., New York

de Duve, C. (1995) The beginnings of the life on earth. *Am. Sci.* **83**, 428–437.

Возможный сценарий последовательности химических реакций, приведших к возникновению первого живого организма.

de Duve, C. (1996) The birth of complex cells. *Am. Sci.* **274** (April), 50–57.

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**.

Сборник почти 100 статей по всем аспектам пребиотической и ранней биологической эволюции; возмож-

но, лучший источник информации по молекулярной эволюции.

Gesteland, R.F., Atkins, J.F., & Cech, T.R. (eds). (2006) *The RNA World*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Сборник обзорных статей по широкому кругу вопросов, касающихся гипотезы мира РНК.

Lazcano, A. & Miller, S.L. (1996) The origin and early evolution of life: prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time. *Cell* **85**, 793–798.

Краткий обзор развития исследований в области происхождения жизни: примитивные атмосферы, кратеры подводных вулканов, автотрофные/гетеротрофные организмы, мир РНК и пре-РНК, а также продолжительность возникновения жизни.

Margulis, L. (1996) Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1071–1076.

Аргументы в пользу разделения всех живых организмов на пять царств: монеры, протисты, грибы, животные и растения (сравните со статьей Woese et al.).

Margulis, L., Gould, S.J., Schwartz, K.V., & Margulis, A.R. (1998) *Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*, 3rd edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Описание основных групп живых организмов с прекрасными иллюстрациями и электронными микрофотографиями.

Mayr, E. (1997) *This Is Biology: The Science of the Living World*, Belknap Press, Cambridge, MA.

История развития науки, в частности дарвиновской теории эволюции, в изложении знаменитого последователя Дарвина.

Miller, S.L. (1987) Which organic compounds could have occurred on the prebiotic earth? *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**, 17–27.

Свод лабораторных экспериментов по воспроизведению химической эволюции в изложении человека, поставившего знаменитый эксперимент Миллера–Юри.

Woese, C.R. (2002) On the evolution of cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8742–8747.

Краткий ясный обзор.

Woese, C.R. (2004) A new biology for a new century. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 173–186.

Развитие современной мысли о клеточной эволюции пера одного из апологетов данной области.

Woese, C.R., Kandler, O., & Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576–4579.

Аргументы в пользу разделения всех живых организмов на три царства (сравните со статьей Margulis, 1996).

Вопросы и задачи

Ниже представлены некоторые вопросы и задачи, относящиеся к содержанию данной главы. При решении можно пользоваться таблицами, помещенными на заднем форзаце. Каждое задание имеет заголовок, так чтобы читателю легче было определить, к какой теме оно относится. Каждый раз при решении численных задач помните, что в ответе должно стоять корректное число значащих цифр. Краткие решения приведены в Приложении Б; расширенные варианты ответов опубликованы в отдельном издании (David L. Nelson and Michael M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry Absolute Ultimate Guide (Study Guide & Solutions Manual*, W. H. Freeman).

1. Размеры клеток и их компонентов

а) Если увеличить клетку в 10 000 раз (такое увеличение обычно достигается в электронном микроскопе), то какого размера она стала бы? Предположите, что вы рассматриваете «типичную» эукариотическую клетку с диаметром 50 мкм.

б) Если вы рассматриваете мышечную клетку (миоцит), сколько в ней содержится молекул актина? (Считайте, что клетка имеет сферическую форму и не содержит никаких других компонентов; молекулы актина имеют сферическую форму и диаметр 3,6 нм. Объем шара равен $(4/3)\pi r^3$.)

в) Если вы рассматриваете клетку печени (гепатоцит) таких же размеров, сколько в ней может содержаться митохондрий? (Считайте, что клетка имеет сферическую форму и не содержит никаких других компонентов; митохондрии имеют сферическую форму и диаметр 1,5 мкм.)

г) Глюкоза служит основным источником энергии для большинства клеток. Пусть внутриклеточная концентрация глюкозы равна 1 мМ (т. е. 1 миллимоль/л). Рассчитайте число молекул глюкозы, содержащихся в нашей гипотетической эукариотической клетке (сферической формы). (Число Авогадро, равное числу молекул в 1 моле неионизированного вещества, составляет $6,02 \cdot 10^{23}$.)

д) Гексокиназа является важным ферментом в метаболизме глюкозы. Если концентрация гексокиназы в нашей эукариотической клетке равна 20 мкМ, то сколько молекул глюкозы приходится на одну молекулу гексокиназы?

2. Компоненты клетки *E. coli*. Клетки *E. coli* имеют форму цилиндра высотой 2 мкм и диаметром 0,8 мкм. Объем цилиндра вычисляется по формуле $\pi r^2 h$, где h — высота цилиндра.

а) Сколько весит одна клетка *E. coli*, если ее плотность (в основном за счет воды) равна в среднем $1,1 \cdot 10^3$ г/л?

б) Толщина защитной клеточной оболочки *E. coli* равна 10 нм. Какую долю (в процентах) общего объема бактерии составляет клеточная оболочка?

в) *E. coli* быстро растет и размножается благодаря тому, что в ее клетке присутствует около 15 000 сферических рибосом (диаметр рибосомы 18 нм), осуществляющих синтез белков. Какая часть общего объема клетки приходится на долю рибосом?

3. Генетическая информация в ДНК *E. coli*. Содержащаяся в ДНК генетическая информация определяется линейной последовательностью кодирующих единиц, называемых кодонами. Каждый кодон представляет собой специфическую последовательность из трех нуклеотидов (трех пар нуклеотидов в двухцепочечной ДНК) и соответствует одному аминокислотному остатку в белке. ДНК *E. coli* имеет очень большую молярную массу — около $3,1 \cdot 10^9$ г/моль. Средняя молярная масса пары нуклеотидов равна 660 г/моль, а вклад каждой пары нуклеотидов в длину молекулы ДНК составляет 0,34 нм.

а) Используя эти данные, рассчитайте длину молекулы ДНК *E. coli*. Сравните длину молекулы ДНК с размерами клетки (задача 2). Каким образом ДНК помещается в клетке?

б) Подсчитайте, чему равно максимальное число белков, которое может быть закодировано в молекуле ДНК *E. coli*, если предположить, что белковая молекула состоит в среднем из 400 аминокислот.

4. Высокая скорость метаболизма у бактерий.

Бактерии характеризуются значительно более высокой скоростью метаболизма, чем клетки животных. В идеальных условиях бактериальная клетка обычно увеличивается в размерах вдвое и делится каждые 20 мин, тогда как большинству животных клеток для этого требуется 24 ч. Из-за высокой скорости метаболизма бактериям необходимо иметь большую площадь поверхности по отношению к объему клетки.

а) Почему максимальная скорость метаболизма должна зависеть от соотношения между площадью поверхности клетки и ее объемом?

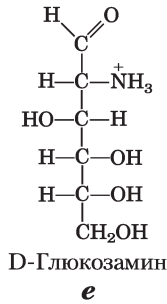
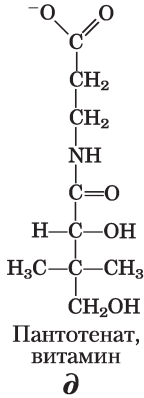
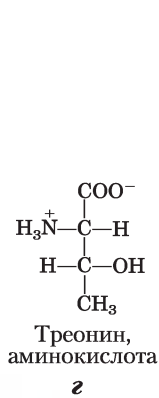
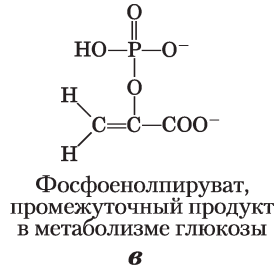
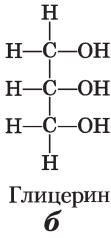
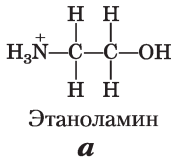
б) Рассчитайте отношение площади поверхности клетки к ее объему у сферической бактерии *Neisseria gonorrhoea*, вызывающей гонорею (диаметр клетки 0,5 мкм). Сравните полученное значение с отношением площади поверхности клетки к ее объему у шаровидной амёбы — крупной эукариотической клетки диаметром 150 мкм. Площадь поверхности сферы рассчитывается по формуле πr^2 .

5. Быстрый транспорт в аксонах. Нейроны имеют длинные тонкие отростки, называемые аксонами. Аксоны обеспечивают передачу сигнала в нервной системе организма. Некоторые аксоны могут достигать длины до 2 м, например аксоны, отходящие от спинного мозга и заканчивающиеся в мышцах пальцев ног. Маленькие заключенные в мембрану частицы, переносящие важные для работы аксонов вещества, движутся вдоль микротрубочек цитоскелета от центра клетки до окончаний аксонов. Если средняя скорость движения этих частиц 1 мкм/с, сколько времени понадобится такой частице (везикуле), чтобы пройти от центра клетки в спинном мозге до окончания аксона в пальцах ног?

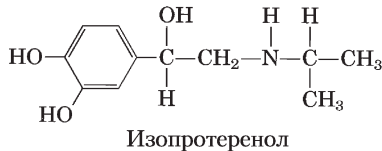
6. Витамин С: отличается ли искусственный витамин С от натурального? Некоторые поставщики обогащенных витаминами пищевых продуктов заявляют, что витамины, полученные из природных источников, полезнее для здоровья, чем синтезированные. Например, считается, что чистая L-аскорбиновая кислота (витамин С) из плодов шиповника полезнее чистой L-аскорбиновой кислоты, синтезированной на химическом производстве. Различаются ли витамины из этих двух источников? Может ли организм различить витамины из разных источников?

7. Идентификация функциональных групп. На рис. 1-15 и 1-16 показаны некоторые функциональные группы, часто встречающиеся в биомолекулах. Поскольку свойства и биологическая активность биомолекул в значительной степени зависят от их функциональных групп, важно уметь их идентифицировать. Укажите функцио-

нальные группы в каждом из приведенных ниже соединений и назовите их.



8. Активность лекарственных веществ и стереохимия. В некоторых случаях количественные различия в биологической активности двух энантимеров одного и того же вещества выражены достаточно сильно. Например, D-изомер изопротеренола (применяется при легких приступах астмы) действует в качестве бронхорасширяющего средства в 50–80 раз сильнее, чем L-изомер. Укажите хиральный центр в молекуле изопротеренола. Почему два энантимера так сильно различаются по биологической активности?

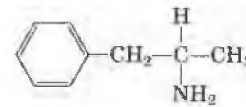


9. Разделение биомолекул. Для изучения биомолекул определенного вида (белка, нуклеиновой кислоты, углевода или липида) в лабораторных условиях исследователь в первую очередь должен отделить эти молекулы от других, присутствующих в образце, т. е. провести *очистку*. Специфические методы очистки описаны далее в тексте. Однако, глядя на формулы мономерных звеньев биомолекул, вы уже сейчас можете

указать несколько характерных особенностей, позволяющих выделить их из смесей с другими молекулами. Например, как бы вы отделили а) аминокислоты от жирных кислот и б) нуклеотиды от глюкозы?

10. Возможна ли кремниевая жизнь? Кремний расположен в той же группе Периодической системы, что и углерод, и может образовывать до четырех одинарных связей. Многие научно-фантастические произведения были основаны на предположении существования кремниевой жизни. Возможно ли это? Какие свойства кремния делают его *менее* подходящим на роль главного элемента жизни по сравнению с углеродом? Чтобы ответить на этот вопрос, вспомните, что вы прочли относительно способности углерода образовывать разнообразные связи, а также воспользуйтесь учебником неорганической химии, чтобы освежить в памяти свои знания о способности кремния образовывать связи.

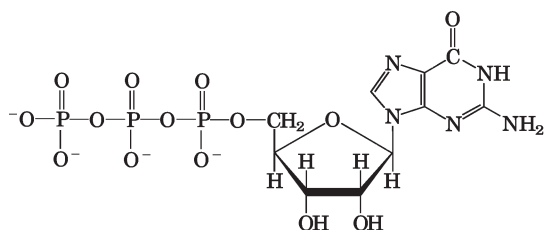
11. Действие лекарственных препаратов и форма молекул. Несколько лет назад две фирмы выпустили в продажу препарат под торговыми названиями декседрин и бензедрин. Структурная формула этого вещества приведена на рисунке.



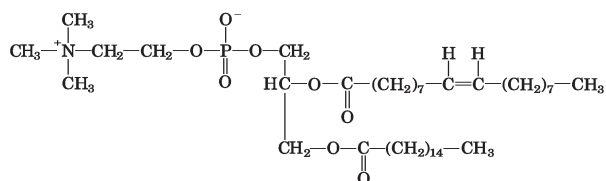
По физическим свойствам (содержанию С, Н и N, температуре плавления, растворимости и др.) оба препарата идентичны. Тем не менее рекомендованная доза декседрина (он до сих пор выпускается) составляла 5 мг/сут., а рекомендованная доза бензедрина (снят с производства) была вдвое выше. Таким образом, для достижения одного и того же физиологического эффекта бензедрина требуется гораздо больше, чем декседрина. Объясните это кажущееся противоречие.

12. Строительные блоки сложных биомолекул. На рис. 1-10 показана структура наиболее важных компонентов сложных биомолекул. Укажите строительные блоки, из которых состоят три изображенные ниже важные биологические биомолекулы (показаны в ионной форме, соответствующей физиологическому значению pH).

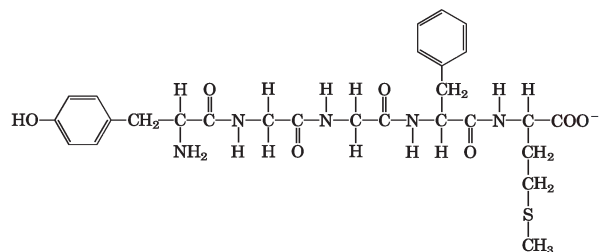
а) Гуанозинтрифосфат (GTP) — энергетически богатая молекула, нуклеотид, входящий в состав РНК:



б) Фосфатидилхолин — компонент многих мембран:



в) Метэнкефалин (энкефалин, содержащий в пятом положении метионин) — природный опиат мозга:



13. Определение структуры биомолекулы.

Из мышц кролика выделили неизвестное вещество X. Его структура была установлена на основании следующих наблюдений и экспериментов. Результаты качественного анализа показали, что вещество содержит только углерод, водород и кислород. Навеска вещества X была подвергнута полному окислению, после чего определены количества образовавшихся H_2O и CO_2 . Из данных этого анализа было сделано заключение, что массовые доли C, H и O в веществе X составляют 40,0, 6,71 и 53,29% соответственно. Молекулярная масса вещества X по данным масс-спектрометрии равна 90,0 а. е. м. (см. дополнение 1-1). Методом инфракрасной спектроскопии показано, что в молекуле X есть одна двойная связь. Вещество X легко растворяется в воде, образуя кислый

раствор. При исследовании этого раствора с помощью поляриметра было установлено, что X обладает оптической активностью.

а) Определите эмпирическую и молекулярную формулы X.

б) Нарисуйте возможные структуры вещества X, которые удовлетворяли бы молекулярной формуле и имели одну двойную связь. Рассмотрите только линейные или разветвленные структуры, не принимая во внимание циклические структуры. Учтите, что атомы кислорода с трудом образуют связи между собой.

в) Какое значение структуры при определении имеет оптическая активность вещества? Какие структуры, предложенные вами в пункте (б), соответствуют этому наблюдению?

г) Какое значение для структуры молекулы имеет тот факт, что при растворении вещества X образуется кислый раствор? Какие структуры, предложенные вами в пункте (б), соответствуют этому наблюдению?

д) Каково строение вещества X? Совместимо ли со всеми имеющимися данными существование нескольких структур?

Анализ экспериментальных данных

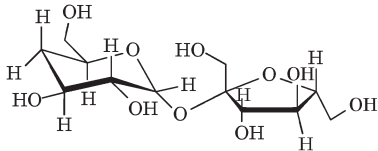
14. Сладкий вкус вещества. Человек многие вещества воспринимает как сладкие. Сладкий вкус возникает, когда молекула вещества связывается с рецептором сладкого — одним типом рецепторов на поверхности определенных клеток языка. Чем прочнее связывание, тем меньшей концентрации вещества достаточно для насыщения рецепторов и тем более сладкий вкус обеспечивает данная концентрация вещества. Изменение свободной энергии ΔG° в реакции связывания сладкого вещества с рецептором можно измерить в килоджоулях или в килокалориях на моль.

Количественно сладкий вкус можно определять в относительных единицах, принимая за точку отсчета (за 1 ед.) сладость сахарозы. Например, сладость сахарина составляет 161 ед., что означает, что он в 161 раз слаще сахарозы. На практике эту величину определяют, сравнивая по вкусу сладость растворов, содержащих различную концентрацию каждого сладкого вещества. Растворы сахарозы и сахарина имеют

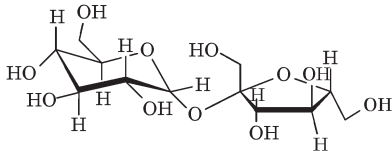
одинаковую сладость, когда сахара взята в концентрации в 161 раз выше, чем концентрация сахарина.

а) Какова связь относительной сладости вещества и ΔG° реакции связывания? В частности, более отрицательное значение ΔG° соответствует большей или меньшей относительной сладости? Объясните свой ответ.

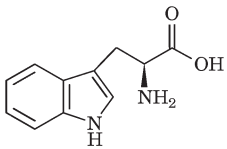
Ниже представлены структуры 10 веществ, каждое из которых кажется человеку сладким на вкус. Для каждого вещества представлены значения относительной сладости и ΔG° реакции связывания с рецептором сладости.



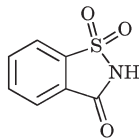
Дезоксисахароза
отн. сладость 0,95
 $\Delta G^\circ = -6,67$ ккал/моль



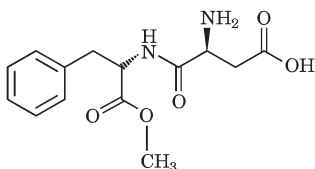
Сахароза
отн. сладость 1
 $\Delta G^\circ = -6,71$ ккал/моль



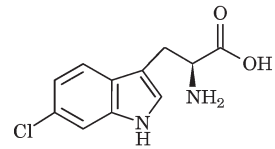
D-Триптофан
отн. сладость 21
 $\Delta G^\circ = -8,5$ ккал/моль



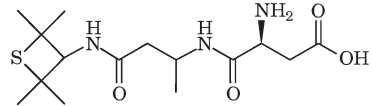
Сахарин
отн. сладость 161
 $\Delta G^\circ = -9,7$ ккал/моль



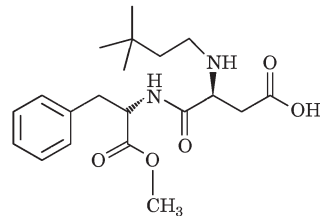
Аспартам
отн. сладость 172
 $\Delta G^\circ = -9,7$ ккал/моль



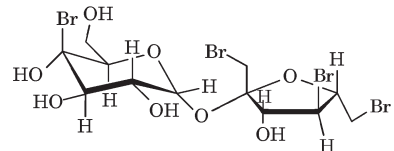
6-Хлор-D-триптофан
отн. сладость 906
 $\Delta G^\circ = -10,7$ ккал/моль



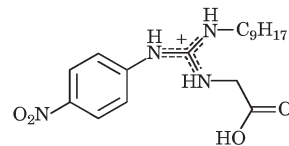
Алитам
отн. сладость 1 937
 $\Delta G^\circ = -11,1$ ккал/моль



Неотам
отн. сладость 11 057
 $\Delta G^\circ = -12,1$ ккал/моль



Тетрабромсахароза
отн. сладость 13 012
 $\Delta G^\circ = -12,2$ ккал/моль



Сукроновая кислота
отн. сладость 200 000
 $\Delta G^\circ = -13,8$ ккал/моль

Морини, Бассоли и Темусси (2005) использовали компьютерные методы (методы *in silico*) для моделирования связывания молекул сладких веществ с рецепторами.

б) В чем преимущество компьютерного метода определения сладости веществ по сравнению с органолептическим методом определения сладости человеком или животными?

В своих ранних работах Шалленбергер и Акре (1967) предположили, что все сладкие вещества имеют структурную группу АН–В, где А и В – электроотрицательные атомы, разделенные расстоянием не менее 2,5 Å (0,25 нм), но не более 4 Å (0,4 нм); Н – атом водорода, связанный с одним из электроотрицательных атомов ковалентной связью (с. 481).

в) Учитывая, что длина «типичной» одинарной связи составляет 0,15 нм, идентифицируйте группы АН–В в каждой приведенной выше молекуле.

г) На основании своего ответа на вопрос (в) выскажите два возражения против утверждения, что «молекулы, имеющие структурную группу АН–В, сладкие».

д) Для двух приведенных выше молекул модель АН–В позволяет объяснить различия в относительной сладости и величине ΔG° . Какие это молекулы и как с их помощью подтвердить справедливость данной модели?

Многие приведенные выше молекулы, имеющие очень похожую структуру, весьма сильно различаются по сладости и величине ΔG° . Приведите два примера и с их помощью покажите, почему модель АН–В не может объяснить различия в сладости и значении ΔG° .

В своем методе компьютерного моделирования для предсказания величины ΔG° в реакции связывания сладкого вещества и рецептора сладости Морини с соавторами использовали трехмерную структуру рецептора сладости и специальную программу для моделирования динамики молекул (GRAMM). Сначала они «тренировали» свою модель, т. е. изменяли параметры модели таким образом, чтобы предсказанные моделью значения ΔG° совпадали с известными значениями ΔG° для определенного ряда веществ. А затем они «тестировали» модель, пытаясь предсказать значения ΔG° для нового набора молекул.

е) Почему Морини с соавторами тестировали модель на другом ряде веществ, а не на том же, на котором проводилась «тренировка» модели?

ж) Оказалось, что предсказываемые значения ΔG° для тестируемого набора веществ отличаются от реальных значений в среднем на 1,3 ккал/моль. Используя значения, приведенные для перечисленных выше молекул, оцените ошибку в определении относительной сладости.

Литература

Morini, G., Bassoli, A., & Temussi, P.A. (2005) From small sweeteners to sweet proteins: anatomy of the binding sites of the human T1R2–T1R3 receptor. *J. Med. Chem.* **48**, 5520–5529.

Schallenberger, R.S. & Acree, T.E. (1967) Molecular theory of sweet taste. *Nature* **216**, 480–482.

ЧАСТЬ I

Строение и катализ

- 
- 2 Вода 73
 - 3 Аминокислоты, пептиды и белки 113
 - 4 Трехмерная структура белков 171
 - 5 Функции белков 225
 - 6 Ферменты 269
 - 7 Углеводы и гликобиология 339
 - 8 Нуклеотиды и нуклеиновые кислоты 391
 - 9 Технологии на основе информации ДНК 433
 - 10 Липиды 487
 - 11 Биологические мембраны и транспорт 525
 - 12 Биосигнализация 591

Биохимия, можно сказать без преувеличения, это химия жизни, и живые организмы (именно живые) могут быть, таким образом, исследованы, проанализированы, а также поняты их функции. Приступая к изучению биохимии, каждый студент должен узнать ее язык и основные принципы: это-то мы и будем обсуждать в части I.

Главы части I посвящены структуре и функциям основных веществ в составе клетки: воды (гл. 2), аминокислот и белков (гл. 3–6), сахаров и полисахаридов (гл. 7), нуклеотидов и нуклеиновых кислот (гл. 8), жирных кислот и липидов (гл. 10) и, наконец, мембран и мембранных сигнальных белков (гл. 11 и 12). Рассказ о каждом типе молекул сопровождается обсуждением подходов, применяющихся для их изучения. Описание некоторых методов включено в основное содержание главы, а одна глава (гл. 9) целиком

посвящена биотехнологии, связанной с клонированием, геномикой и протеомикой.

Знакомство с биохимией начинается с воды (гл. 2), поскольку ее свойства важны для структуры и функций всех других компонентов клетки. При изучении каждого класса органических молекул мы в первую очередь будем рассматривать ковалентные взаимодействия между мономерными звеньями (аминокислотами, моносахаридами, нуклеотидами и жирными кислотами), а затем описывать структуру макромолекул и построенных из них надмолекулярных комплексов. Основная идея такого изложения состоит в том, что полимерные макромолекулы в живых системах, несмотря на свои большие размеры, — высокоупорядоченные химические соединения, имеющие строго определенную последовательность мономерных звеньев, определяющую их структуру и функции.

Это утверждение строится на трех взаимосвязанных принципах: 1) уникальная структура каждой макромолекулы определяет ее функции; 2) нековалентные взаимодействия имеют ключевое значение для структуры, а следовательно, для функционирования макромолекул; 3) мономерные звенья в полимерных макромолекулах соединены в специфические последовательности, которые содержат в себе информацию, определяющую организацию живых систем.

Структурно-функциональные взаимосвязи молекул особенно наглядно проявляются в белках, характеризующихся невероятным разнообразием функций. Одна специфическая последовательность аминокислот образует прочную структуру нитей, из которых состоят волосы и шерсть, другая образует белок, переносящий кислород в крови, третья связывает другие белки и катализирует расщепление их внутримолекулярных связей. Аналогичным образом, особые функции полисахаридов, нуклеиновых кислот и липидов являются прямым проявлением их химической структуры, т. е. определяются свойствами мономерных звеньев и точным порядком их соединения в полимерную цепь. Цепочки сахарных остатков могут служить источником энергии, структурными волокнами и специфическими участками узнавания; соединенные в ДНК или РНК нуклеотиды содержат в себе план устройства всего организма; комплексы липидов образуют мембраны. Глава 12 обобщает материал, касающийся функционирования биомолекул. В ней описывается, как специфические сигнальные системы регулируют активность биомолекул и поддерживают гомеостаз на уровне клетки, органа или всего организма в целом.

При переходе мономерных звеньев к все более крупным полимерным молекулам основную роль начинают играть не ковалентные, а другие типы взаимодействий. Несомненно, ковалентные

связи и внутри мономерных звеньев, и между ними в полимерной молекуле накладывают ограничения на возможную форму макромолекулы. Однако именно многочисленные нековалентные взаимодействия определяют устойчивую нативную конформацию биомолекулы и в то же время делают ее достаточно гибкой, что существенно для биологических функций. Как мы увидим, нековалентные связи играют важнейшую роль в проявлении каталитической активности ферментов, во взаимодействии комплементарных оснований в составе нуклеиновых кислот, а также в расположении и свойствах липидов в мембранах.

Тот принцип, что последовательность мономерных звеньев заключает в себе определенную информацию, с наибольшей полнотой раскрывается в обсуждении свойств нуклеиновых кислот (гл. 8). Однако белки и некоторые низкомолекулярные сахара (олигосахариды) также выполняют функции информационных молекул. Аминокислотная последовательность белков содержит в себе информацию, определяющую сворачивание белка в специфическую трехмерную структуру, и в итоге отвечает за его функционирование. Некоторые олигосахариды также имеют уникальную первичную последовательность и трехмерную структуру, распознаваемую другими макромолекулами.

Во всех классах биомолекул легко обнаруживается сходная структурная иерархия: макромолекулы образуются из мономерных звеньев определенного строения с помощью довольно прочных связей. Трехмерная структура биомолекул поддерживается нековалентными взаимодействиями. Далее эти макромолекулы могут образовывать надмолекулярные комплексы и органеллы, которые осуществляют метаболические функции в клетках. Все молекулы, описанные в части I, являются строительным материалом жизни.

Я верю, что использование методов структурной химии для решения проблем физиологии позволит показать, что роль водородных связей в физиологии больше, чем любых других структур.

Лайнус Полинг, Природа химической связи, 1939

2

Вода

- 2.1. Слабые взаимодействия в водных средах 73
- 2.2. Ионизация воды, слабые кислоты и слабые основания 89
- 2.3. Роль буферных систем в поддержании pH в биологических системах 96
- 2.4. Участие воды в реакциях 104
- 2.5. Живые организмы приспособлены к водной среде 105

Вода — самое распространенное вещество в живой природе; массовая доля воды в большинстве живых организмов составляет 70% и более. Первые живые организмы на Земле, несомненно, появились в водной среде, и ход эволюции определялся свойствами того водного окружения, в котором возникла жизнь.

Данная глава начинается с рассмотрения физических и химических свойств воды, к которым адаптированы все структурные элементы и функции живой клетки. Для структуры и функций биомолекул необычайно важное значение имеют силы притяжения между молекулами воды и ее слабая ионизованность. При рассмотрении вопроса об ионизации поговорим о константах равновесия реакции диссоциации воды, pH и кривых титрования, а также покажем, как водные растворы слабых кислот и оснований и их соли действуют в качестве буферов, препятствуя изменениям pH в биологических системах. Молекула воды и продукты ее диссоциации (H^+ и OH^-) оказывают глубокое

влияние на структуру, процесс сборки и свойства всех клеточных компонентов, прежде всего белков, нуклеиновых кислот и липидов. Свойства воды как растворителя, включая способность образовывать водородные связи между собственными молекулами и молекулами растворенных веществ, решающим образом влияют на нековалентные взаимодействия, ответственные за силу связывания и специфичность «узнавания» биомолекул.

2.1. Слабые взаимодействия в водных средах

Наличие водородных связей приводит к прочному сцеплению молекул воды и делает ее жидкой при комнатной температуре, а также способствует образованию высокоупорядоченной кристаллической структуры льда (твердое состояние). Полярные биомолекулы легко растворяются в воде, поскольку разрушают ассоциаты из молекул воды из связи вода–вода с образованием энергетически более выгодной связи вода–растворенное вещество. Напротив, неполярные вещества не способны связываться с молекулами воды, другими словами, неполярные вещества плохо растворяются в воде. В водных растворах неполярные вещества часто образуют кластеры.

Водородные связи, ионные, гидрофобные (от греч. *боящийся воды*) и ван-дер-ваальсовы взаимодействия по отдельности довольно слабые, однако вместе они оказывают весьма значительное влияние на трехмерную структуру белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и мембранных липидов.

Таблица 2-1 Температура плавления, температура кипения и теплота испарения некоторых растворителей

	Температура плавления (°C)	Температура кипения (°C)	Теплота испарения (Дж/г)*
Вода	0	100	2 260
Метанол (CH ₃ OH)	-98	65	1 100
Этанол (CH ₃ CH ₂ OH)	-117	78	854
Пропанол (CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH)	-127	97	687
Бутанол (CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₂ OH)	-90	117	590
Ацетон (CH ₃ COCH ₃)	-95	56	523
Гексан (CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃)	-98	69	423
Бензол (C ₆ H ₆)	6	80	394
Бутан (CH ₃ (CH ₂) ₂ CH ₃)	-135	-0,5	381
Хлороформ (CHCl ₃)	-63	61	247

*Количество теплоты, необходимое для превращения 1,0 г жидкости при температуре ее кипения и атмосферном давлении в газообразное состояние. Эта величина является мерой той энергии, которую нужно затратить на преодоление сил притяжения между молекулами в жидкой фазе.

Необычные свойства воды обусловлены наличием водородных связей

По сравнению с большинством других жидкостей вода имеет высокие температуры плавления и кипения и теплоту испарения (табл. 2-1). Эти особенности воды хорошо объясняются сильным притяжением между соседними молекулами, вследствие чего жидкая вода характеризуется большим внутренним сцеплением. Причину подобных межмолекулярных взаимодействий можно понять, если рассмотреть электронную структуру молекулы H₂O.

Каждый атом водорода в молекуле воды имеет общую пару электронов с атомом кислорода. Геометрия молекулы определяется формой внешних электронных орбиталей кислорода; здесь можно увидеть аналогию со связывающими sp³ орбиталями углерода (рис. 1-14). Орбитали кислорода вытянуты к углам неправильного тетраэдра, имеющего по одному атому водорода в каждом из двух углов и неподеленные электронные пары кислорода в двух других углах (рис. 2-1, а). Угол, образуемый связью Н–О–Н, составляет 104,5° — чуть меньше, чем в правильном тетраэдре (109,5°), что связано с взаимным отталкиванием неподеленных электронных пар кислорода.

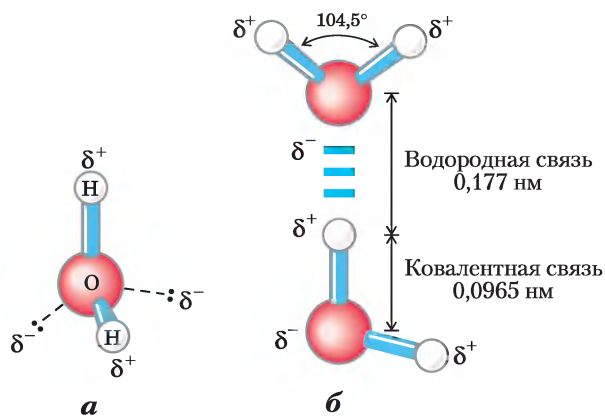


Рис. 2-1. Строение молекулы воды. а) Биполярная природа молекулы воды показана с помощью шаростержневой модели. Пунктирными линиями обозначены несвязывающие орбитали. Электронные пары, расположенные на внешних электронных орбиталях, образуют вокруг атома кислорода неправильный тетраэдр. Каждый атом водорода несет частичный положительный (δ^+), а атом кислорода — частичный отрицательный заряд (δ^-). б) Две молекулы H₂O связаны водородной связью (здесь и далее водородная связь обозначается тремя голубыми черточками), соединяющей атом кислорода верхней молекулы и атом водорода нижней молекулы. Водородные связи длиннее и слабее, чем ковалентные связи О–Н.

Ядро атома кислорода притягивает электроны сильнее, чем ядро водорода (протон), т. е. кислород является более электроотрицательным. В результате положение поделенных пар электронов между кислородом и водородом несимметричное — электроны расположены ближе к атому кислорода, чем к атому водорода. Такая асимметрия приводит к образованию в молекуле воды двух электрических диполей — по одному вдоль каждой связи Н–О. В результате на водородах локализуется частичный положительный заряд (δ^+), а на кислороде — частичный отрицательный, равный по модулю сумме двух частичных положительных зарядов ($2\delta^-$). Этим и объясняется электростатическое притяжение между атомом кислорода одной молекулы воды и атомом водорода другой молекулы (рис. 2-1, б), называемое **водородной связью**. В данной книге мы будем изображать водородную связь в виде трех голубых параллельных черточек, как на рис. 2-1, б.

Водородные связи сравнительно слабые. **Энергия диссоциации** (энергия, необходимая для разрыва связи) водородной связи в жидкой воде составляет 23 кДж/моль, тогда как энергия диссоциации ковалентной связи О–Н воды равна 470 кДж/моль, а ковалентной С–С-связи 348 кДж/моль. В образование водородной связи 10% вносят ковалентные взаимодействия (за счет перекрывания электронных орбиталей), а 90% — электростатические взаимодействия. При комнатной температуре тепловая энергия водного раствора (кинетическая энергия движения отдельных атомов и молекул) имеет тот же порядок величины, что и энергия диссоциации водородной связи. При нагревании воды скорость отдельных молекул увеличивается. В каждый момент времени большинство молекул жидкой воды участвует в образовании водородных связей, однако время жизни каждой водородной связи составляет лишь от 1 до 20 пикосекунд ($1 \text{ пс} = 10^{-12} \text{ с}$). При разрыве одной водородной связи через 0,1 пс образуется другая — с тем же или новым партнером. Короткоживущие группы молекул воды, связанные водородными связями, были удачно названы «мерцающими кластерами». Множество водородных связей между молекулами воды создают сильное внутреннее сцепление в жидкой воде. Протяженная сетчатая структура связанных водородными связями молекул воды может включать в себя и молекулы растворенных веществ (белков, ну-

клеиновых кислот и др.), что позволяет большим молекулам взаимодействовать друг с другом на расстояниях в несколько нанометров без прямого физического контакта.

Поскольку расположение электронных орбиталей вокруг атома кислорода близко к тетраэдрическому (рис. 2-1, а), каждая молекула воды способна образовать водородные связи максимум с четырьмя соседними молекулами воды. Так как в жидком состоянии при атмосферном давлении молекулы воды находятся в непрерывном движении, то считают, что каждая молекула в любой момент времени образует водородные связи в среднем с 3,4 других молекул. Напротив, во льду молекулы зафиксированы в пространстве и оказываются связанными с максимально возможным количеством соседей; при этом образуется регулярная пространственная решетка (рис. 2-2). Для того чтобы разорвать достаточное число водородных связей и нарушить кристаллическую решетку

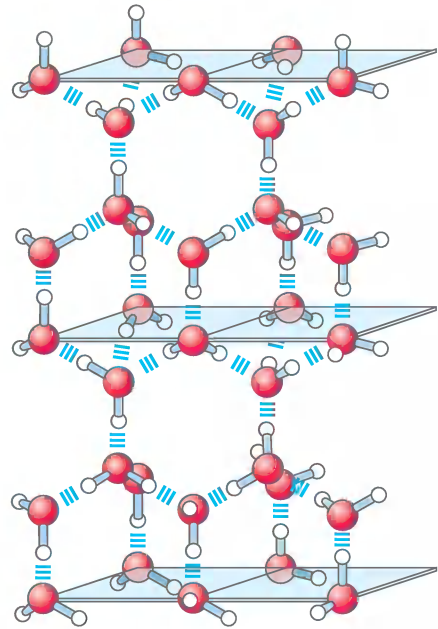
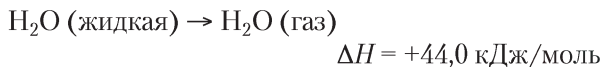
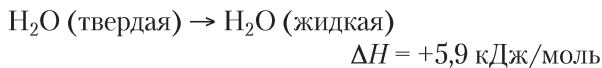


Рис. 2-2. Водородные связи между молекулами воды во льду. Каждая молекула воды во льду связана с четырьмя другими молекулами воды (максимально возможное число для воды), так что при этом образуется регулярная кристаллическая решетка. В жидкой воде при комнатной температуре и при атмосферном давлении каждая молекула воды связана водородными связями приблизительно с 3,4 молекул. Кристаллическая решетка льда более рыхлая (лед имеет меньшую плотность, чем вода), и поэтому лед плавает на поверхности воды.

льда, требуется много тепловой энергии, что выражается в сравнительно высокой температуре плавления воды (табл. 2-1). При плавлении льда или испарении воды затрачивается тепловая энергия:



В процессе плавления или испарения энтропия системы повышается, поскольку высокоорганизованная структура молекул (лед) переходит в менее организованное (вода) или в полностью дезорганизованное состояние (пар). При комнатной температуре плавление льда и испарение воды происходят самопроизвольно: стремление молекул воды ассоциировать посредством образования водородных связей оказывается слабее энергетической выгоды от перехода к хаотическому состоянию. Вспомним, что для самопроизвольного протекания процесса изменение свободной энергии (ΔG) должно быть отрицательной величиной: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, где ΔG представляет собой движущую силу процесса, ΔH — изменение энтальпии, связанное с образованием и разрывом связей, а ΔS отражает изменение упорядоченности системы. Поскольку в процессах плавления и испарения $\Delta H > 0$ (теплота поглощается), именно повышение энтропии (ΔS) делает значение ΔG отрицательным и способствует данным превращениям.

Вода образует водородные связи с полярными растворенными веществами

Водородные связи существуют не только в воде. Они легко образуются между электроотрицательным атомом (акцептором водорода, в качестве которого обычно выступает кислород или азот) и атомом водорода, ковалентно связанным с другим электроотрицательным атомом (донором водорода) в той же самой или в другой молекуле (рис. 2-3). Атомы водорода, связанные ковалентной связью с углеродом, не участвуют в образовании водородных связей, поскольку электроотрицательность атома углерода лишь немного выше, чем водорода, и следовательно, связь C—H практически неполярна. Именно этим различием объясняется сравнительно высокая температура

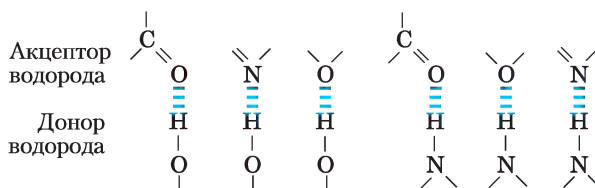
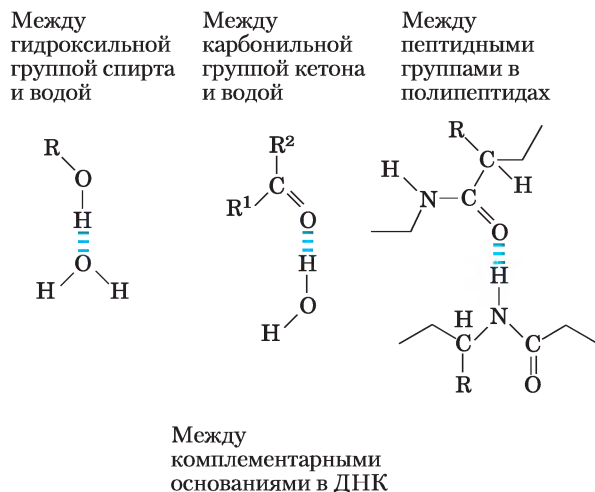


Рис. 2-3. Типы водородных связей, наиболее часто встречающиеся в биологических системах. Акцептором водорода обычно служит атом кислорода или азота; донором водорода является другой электроотрицательный атом.

кипения бутилового спирта $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{OH}$ (117°C) и низкая — у бутана $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ ($-0,5^\circ\text{C}$). В молекуле бутилового спирта есть полярная гидроксильная группа, которая может участвовать в образовании межмолекулярных водородных связей. Незаряженные, но полярные



Между комплементарными основаниями в ДНК

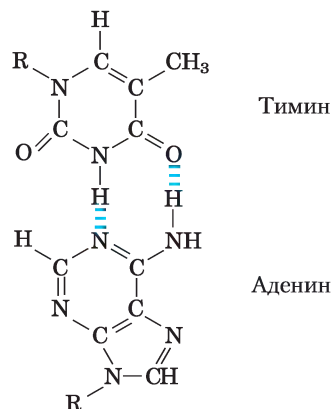


Рис. 2-4. Некоторые водородные связи, имеющие важное значение для биологических систем.

биомолекулы (такие как сахара) легко растворяются в воде благодаря стабилизационному эффекту от образования водородных связей между гидроксильными группами или карбонильным кислородом сахара и полярными молекулами воды. Спирты, альдегиды, кетоны и соединения, содержащие связи N–H, образуют водородные связи с молекулами воды (рис. 2-4) и обычно хорошо растворяются в воде.

Водородные связи обладают наибольшей прочностью в тех случаях, когда взаимная ориентация связанных между собой молекул обеспечивает максимальную энергию электростатического взаимодействия. Такая ситуация наблюдается, если атом водорода и два «делящих» его атома расположены на одной прямой, т. е. если акцептор находится на одной линии с ковалентной связью между атомом донора и атомом водорода (рис. 2-5) и если положительно заряженный ион водорода находится ровно между частичными отрицательными зарядами на атомах кислорода. Другими словами, водородная связь характеризуется определенной направленностью и вследствие этого способна удерживать обе связанные с ее помощью молекулы или группы в определенной ориентации. Ниже мы увидим, что именно это свойство водородных связей способствует стабилизации строго определенных трехмерных структур, характерных для молекул белков и нуклеиновых кислот, имеющих большое число внутримолекулярных водородных связей.

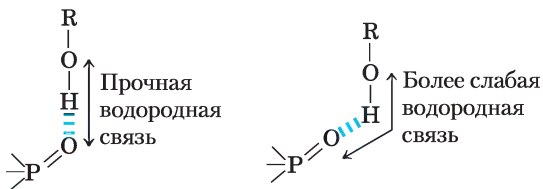


Рис. 2-5. Направленность водородной связи. Максимальное притяжение между частичными электрическими зарядами (рис. 2-1) реализуется в том случае, когда три атома (в данном случае O, H и O), участвующие в образовании водородной связи, лежат на одной прямой. Если группы, участвующие в образовании водородной связи, строго зафиксированы (например, являются частями одной и той же молекулы белка) и такое идеальное расположение невозможно, то образуется более слабая связь.

Между водой и заряженными веществами существуют электростатические взаимодействия

Вода является полярным растворителем. В ней легко растворяется большинство биомолекул, которые обычно представляют собой заряженные или полярные вещества (табл. 2-2). Легко растворяющиеся в воде вещества называют **гидрофильными** (от греч. *любящий воду*). Напротив, неполярные растворители (хлороформ, бензол и др.) плохо растворяют полярные биомолекулы, но хорошо растворяют те вещества, которые обладают **гидрофобными** свойствами, т. е. неполярные молекулы типа липидов и смол.

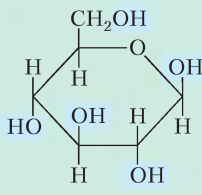
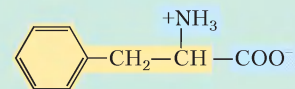
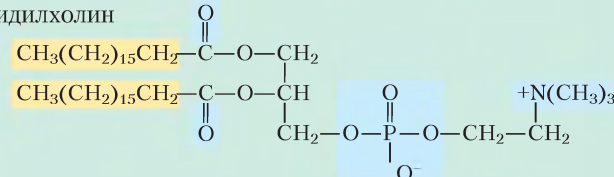
Вода растворяет такие соли, как NaCl, гидратируя и стабилизируя ионы Na^+ и Cl^- путем ослабления электростатических взаимодействий между ними, тем самым препятствуя их ассоциации с образованием кристаллической структуры (рис. 2-6). Те же принципы применимы и к растворению заряженных биомолекул, содержащих такие функциональные группы, как ионизованная карбоксильная группа ($-\text{COO}^-$), протонированная аминогруппа ($-\text{NH}_3^+$), а также эфиры или ангидриды фосфорной кислоты. Вода легко растворяет подобные вещества, при этом водородные связи в молекулах растворенных веществ заменяются водородными связями между растворенным веществом и водой, кроме того, экранируются электростатические взаимодействия между молекулами растворенного вещества.

Воду очень удобно использовать для оценки электростатических взаимодействий между растворенными ионами, поскольку она имеет высокую диэлектрическую проницаемость (этот физический параметр отражает количество диполей в растворителе). Сила ионных взаимодействий в растворе (F) зависит от величины заряда (Q), расстояния между заряженными группами (r) и диэлектрической проницаемости растворителя (ϵ , безразмерная величина), в котором происходит взаимодействие:

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\epsilon r^2}$$

Диэлектрическая проницаемость воды при 25 °С равна 78,5, а для такого неполярного растворителя, как бензол, $\epsilon = 4,6$. Таким образом, ионные взаимодействия между растворенными ионами сильнее проявляются в неполярных, чем

Таблица 2-2 Примеры полярных, неполярных и амфифильных биомолекул (в ионной форме при pH 7)

Полярные		Неполярные	
Глюкоза		Типичная смола	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_2$
Глицин	$^+\text{NH}_3-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Амфифильные	
Аспартат	$^-\text{OOC}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{COO}^-)-$	Фенилаланин	
Лактат	$\text{CH}_3-\text{CH}(\text{OH})-\text{COO}^-$	Фосфатидилхолин	
Глицерин	$\text{HOCH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2\text{OH}$		

Полярная группа
 Неполярная группа

в полярных средах. Зависимость силы ионных взаимодействий от расстояния (от $1/r^2$) приводит к тому, что в воде притяжение или отталкивание

ионов действует лишь на очень коротком расстоянии — в диапазоне от 10 до 40 нм в зависимости от концентрации электролита.

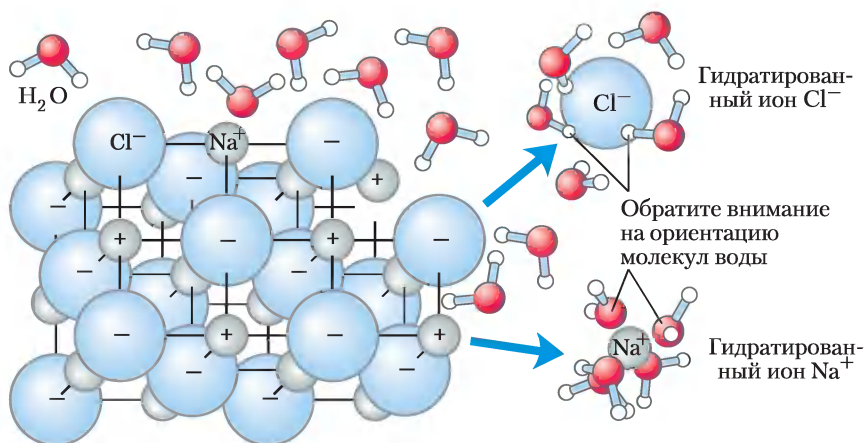


Рис. 2-6. Вода как растворитель. Хорошая растворимость в воде многих кристаллических солей обусловлена гидратацией ионов, образующих эти соли. Кристаллическая решетка NaCl разрушается, по мере того как молекулы воды окружают ионы Na^+ и Cl^- . Заряды ионов частично нейтрализуются, и электростатическое притяжение, которое обуславливает образование решетки, ослабевает.

При растворении кристаллических веществ энтропия возрастает

При растворении соли NaCl ионы Na^+ и Cl^- покидают кристаллическую решетку и получают большую свободу передвижения (рис. 2-6). Легкость растворения в воде таких солей, как NaCl, во многом объясняется ростом энтропии системы (усилением беспорядка). В терминах термодинамики, образованию раствора способствует изменение свободной энергии: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, где ΔH имеет небольшое положительное значение, а $T\Delta S$ — большое положительное значение, отсюда $\Delta G < 0$.

Неполярные газы плохо растворяются в воде

Важные для биологических систем молекулы CO_2 , O_2 и N_2 неполярны. В молекулах кислорода и азота электроны поделены поровну между обоими атомами. В молекуле CO_2 каждая связь $\text{C}=\text{O}$ полярная, однако два диполя имеют противоположное направление и нейтрализуют друг друга (табл. 2-3). Переход молекул из неупорядоченного состояния в газовой фазе в водный раствор нарушает свободу их перемещения и движение молекул воды, т. е. сопровождается снижением энтропии. Неполярная природа молекул и снижение энтропии при переходе из газовой фазы в жидкость определяют очень плохую раствори-

мость этих соединений в воде (табл. 2-3). У некоторых организмов имеются растворимые в воде белки-переносчики (например, гемоглобин и миоглобин), облегчающие транспорт кислорода. Диоксид углерода образует в воде угольную кислоту (H_2CO_3) и переносится в виде бикарбонат-иона (HCO_3^-) либо в свободном состоянии (бикарбонат очень хорошо растворим в воде: ~ 100 г/л при 25°C), либо в комплексе с гемоглобином. Такие газы, как NH_3 , NO и H_2S , также важны для жизнедеятельности некоторых организмов; эти полярные молекулы хорошо растворяются в воде и ионизированы в водных растворах.

Неполярные вещества при растворении вызывают энергетически невыгодные изменения в структуре воды

При смешивании воды с бензолом или гексаном образуются две фазы. Неполярные соединения (бензол и гексан) гидрофобны, т. е. они не способны вступать в энергетически выгодные взаимодействия с молекулами воды и нарушают водородные связи, существующие между молекулами воды. Любые молекулы или ионы, попадая в водный раствор, нарушают там водородные связи, однако полярные или заряженные вещества, такие как NaCl, компенсируют нарушение связей вода–вода образованием новых связей вода–растворенное вещество. Суммар-

Таблица 2-3 Растворимость некоторых газов в воде			
Газ	Структура*	Полярность	Растворимость в воде, г/л ($t_{\text{p-ра}}$)**
Азот	$\text{N}=\text{N}$	Неполярный	0,018 (40°C)
Кислород	$\text{O}=\text{O}$	Неполярный	0,035 (50°C)
Углекислый газ	$\begin{array}{c} \delta \quad \quad \delta \\ \longleftarrow \quad \longrightarrow \\ \text{O}=\text{C}=\text{O} \end{array}$	Неполярный	0,97 (45°C)
Аммиак	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \quad \diagup \\ \text{N} \\ \quad \quad \quad \downarrow \delta \end{array}$	Полярный	900 (10°C)
Сероводород	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \\ \quad \quad \quad \downarrow \delta \end{array}$	Полярный	1,860 (40°C)

* Стрелками показаны диполи: направление от области с частичным положительным зарядом (δ^+ , здесь не показан) к области с частичным отрицательным зарядом (δ^-).

** Обратите внимание, что полярные молекулы растворяются в воде даже при низкой температуре лучше, чем неполярные молекулы при повышенной температуре.

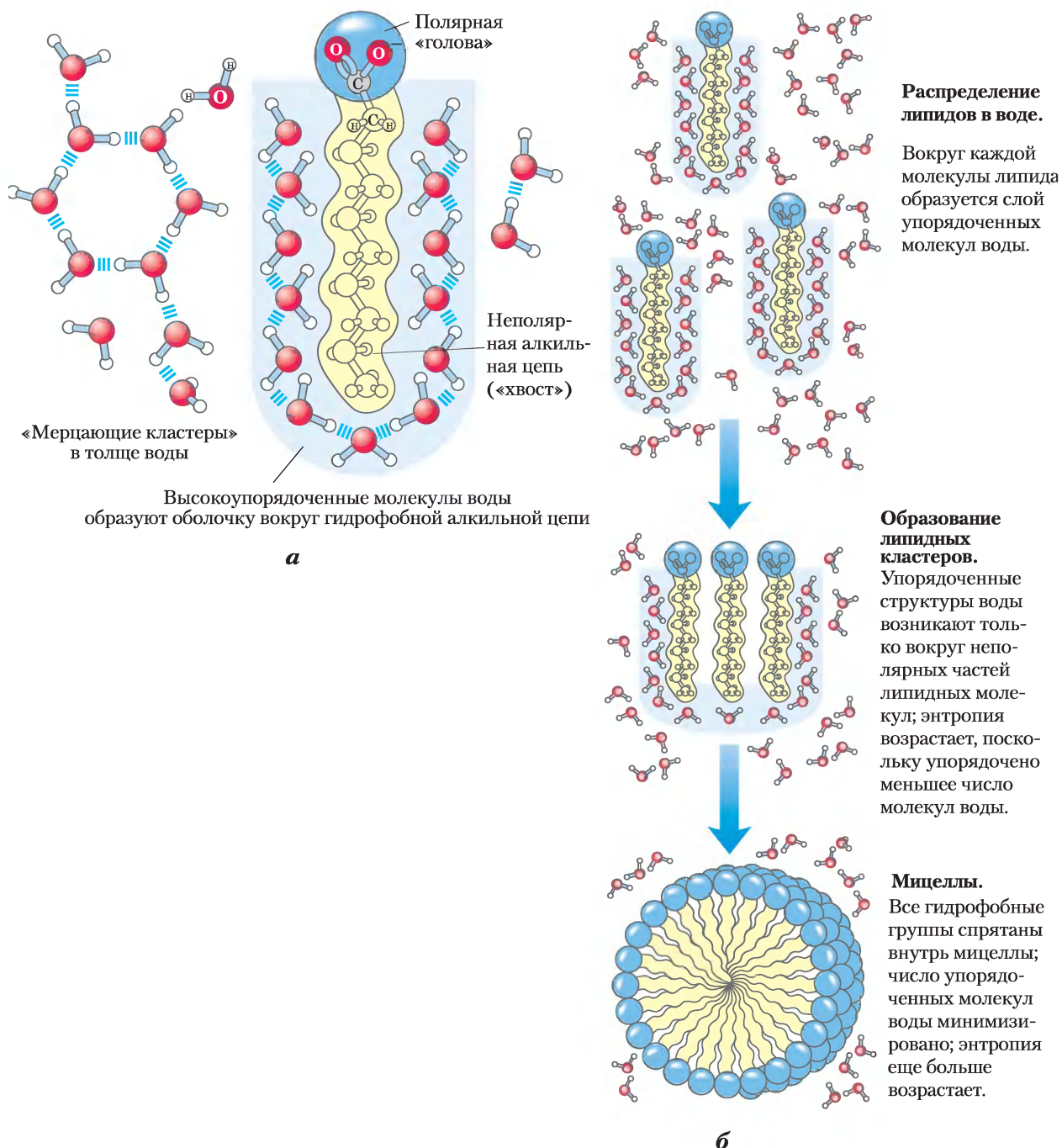


Рис. 2-7. Поведение амфифильных соединений в водном растворе. а) Длинноцепочечные жирные кислоты имеют гидрофобные алкильные цепи, которые окружены слоем упорядоченных молекул воды. б) Образование мицелл приводит к минимизации контакта гидрофобной поверхности жирных кислот с водой, кроме того, в такой структуре минимальное число упорядоченных молекул воды задействовано в образовании оболочки вокруг неполярных молекул. Стабилизация мицеллы происходит за счет выигрыша в энергии в результате высвобождения иммобилизованных молекул воды.

ное изменение энтальпии (ΔH) при растворении таких молекул обычно невелико. Напротив, гидрофобные вещества никак не компенсируют нарушение структуры водородных связей между молекулами воды, поэтому их растворение сопровождается небольшим увеличением энтальпии; разрыв водородных связей между молекулами воды требует определенной энергии, которую необходимо получить из окружающей среды. Кроме этого, растворение в воде гидрофобных веществ приводит к значительному снижению энтропии. Молекулы воды, находящиеся в непосредственной близости от неполярной молекулы, фиксируются в определенной ориентации и формируют высокоупорядоченную оболочку вокруг каждой молекулы растворенного вещества. Молекулы воды, организованные таким образом, имеют не такую упорядоченную структуру, как **клатраты** (кристаллы неполярных веществ и воды), но эффект в обоих случаях достигается один и тот же — упорядочение молекул воды снижает энтропию. Число упорядоченных молекул воды, а следовательно, и уменьшение энтропии, пропорциональны площади поверхности гидрофобного вещества, заключенного в оболочку из молекул воды. Таким образом, изменение свободной энергии, сопровождающее растворение неполярного вещества в воде, не благоприятствует этому процессу: $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, где ΔH — положительное число, ΔS — отрицательное число, отсюда $\Delta G > 0$.

Амфифильные соединения имеют как полярные (заряженные), так и неполярные группы (табл. 2-2). При смешивании амфифильного соединения с водой его полярные гидрофильные области стремятся раствориться, однако неполярные гидрофобные области пытаются избежать контакта с растворителем (рис. 2-7, а). Неполярные группы собираются вместе и образуют кластеры с минимальной поверхностью, а полярные группы располагаются так, чтобы максимально увеличить свои контакты с водой (рис. 2-7, б). В результате в воде образуются устойчивые структуры амфифильных веществ, называемые **мицеллами**, которые могут состоять из сотен или тысяч молекул. Силы, удерживающие вместе неполярные группы молекул растворенного вещества, называют **гидрофобными взаимодействиями**. Они не связаны с внутренним притяжением между неполярными остатками. Скорее, здесь

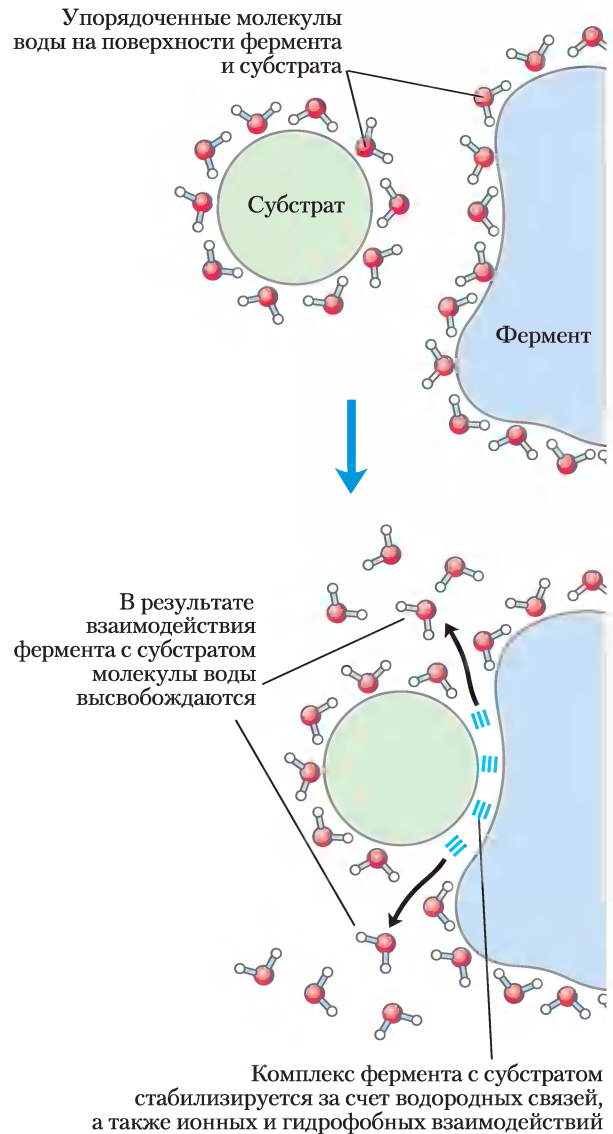


Рис. 2-8. Высвобождение упорядоченных молекул воды способствует образованию фермент-субстратного комплекса. Как вокруг молекулы фермента, так и вокруг молекулы субстрата существует слой упорядоченных молекул воды. Связывание фермента с субстратом приводит к высвобождению некоторого количества упорядоченных молекул. Повышение энтропии является термодинамическим стимулом образования фермент-субстратного комплекса (см. с. 282).

реализуется стремление системы достичь максимальной термодинамической стабильности путем минимизации числа упорядоченных молекул воды, которые окружают гидрофобные участки молекул растворенного вещества.

Многие биомолекулы являются амфифильными: белки, пигменты, некоторые витамины, а также стеролы и фосфолипиды в мембранах имеют как полярные, так и неполярные участки. Образованные такими молекулами структуры удерживаются за счет гидрофобных взаимодействий между неполярными группами. Гидрофобные взаимодействия между липидами, а также между липидами и белками являются важнейшим принципом построения биологических мембран. Гидрофобные взаимодействия между неполярными аминокислотами играют роль в стабилизации трехмерной структуры белков.

Образование водородных связей между водой и полярными соединениями также приводит к упорядочиванию молекул воды, однако в случае растворения неполярных веществ энергетический эффект меньше. Часть движущей силы, направленной на связывание полярного субстрата (реагирующего вещества) с комплементарной полярной поверхностью фермента, расходуется на повышение энтропии, поскольку фермент выталкивает упорядоченные молекулы воды с поверхности субстрата, а субстрат выталкивает упорядоченные молекулы воды с поверхности фермента (рис. 2-8).

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия обусловлены слабыми силами межатомного притяжения

При слишком близком контакте двух незаряженных атомов происходит взаимодействие окружающих их электронных облаков. Случайные вариации положения электронов вокруг одного ядра могут создавать электрический диполь, который способен индуцировать противоположный электрический диполь в соседнем атоме. Два диполя слабо притягиваются друг к другу, в результате чего ядра сближаются. Такие слабые силы притяжения называют **ван-дер-ваальсовым притяжением** (или **силами Лондона**). По мере сближения двух ядер возникает противоположно направленная сила отталкивания их электронных облаков. В точке, где общее притяжение максимально, говорят, что ядра находятся в ван-дер-ваальсовом контакте. Каждый атом характеризуется **ван-дер-ваальсовым радиусом**, определяющим, насколько близко этот атом позволяет подойти другому атому (табл. 2-4). В приведенных в данной книге СРК-моделях молекул размеры всех атомов соотносятся, как их ван-дер-ваальсовы радиусы.

Таблица 2-4		
Ван-дер-ваальсовы радиусы и ковалентные радиусы (при образовании одинарной связи) некоторых элементов		
Элемент	Ван-дер-ваальсов радиус (нм)	Ковалентный радиус (в одинарной связи) (нм)
H	0,11	0,030
O	0,15	0,066
N	0,15	0,070
C	0,17	0,077
S	0,18	0,104
P	0,19	0,110
I	0,21	0,133

Источники: значения ван-дер-ваальсовых радиусов приводятся по Chauvin, R. (1992) Explicit periodic trend of van der Waals radii. *J. Phys. Chem.* 96, 9194–9197. Значения ковалентных радиусов приводятся по Pauling, L. (1960) *Nature of the chemical bond*, 3rd ed., Cornell University Press, Ithaca, NY.

Замечание: ван-дер-ваальсовы радиусы описывают пространственные размеры атома. Если два атома связаны ковалентной связью, то атомные радиусы в участке связывания меньше ван-дер-ваальсовых радиусов, поскольку связанные атомы объединены общей электронной парой. Расстояния между ядрами при ван-дер-ваальсовых взаимодействиях или при образовании ковалентной связи приблизительно равны соответственно сумме ван-дер-ваальсовых или ковалентных радиусов двух атомов. Таким образом, длина одинарной связи C–C примерно равна 0,077 нм + 0,077 нм = 0,154 нм.

Слабые взаимодействия играют очень важную роль в структуре и функциях макромолекул

Описанные нами выше нековалентные взаимодействия (водородные связи, а также ионные, гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия) (табл. 2-5) гораздо слабее ковалентных. Энергия разрыва одинарной связи C–C 350 кДж/моль, связи C–H 410 кДж/моль, а для ван-дер-ваальсовых сил она составляет всего лишь 4 кДж/моль. Гидрофобные взаимодействия также гораздо слабее ковалентных связей, однако они значительно усиливаются в растворе полярного растворителя (например, в концентрированном солевом растворе). Прочность ионных взаимодействий и водородных связей зависит от полярности растворителя и расположения связанных с водородом атомов, но она всегда меньше прочности ковалент-

Таблица 2-5

Четыре типа нековалентных («слабых») взаимодействий между биомолекулами в водном растворе

Водородные связи	
Между нейтральными группами	
Между пептидами	
Ионные взаимодействия	
Притяжение	$-\text{NH}_3^+ \rightarrow \leftarrow -\text{O}-\overset{\text{C}}{\parallel}$
Отталкивание	$-\text{NH}_3^+ \leftarrow \rightarrow \text{H}_3\text{N}^+ -$
Гидрофобные взаимодействия	
Ван-дер-ваальсовы взаимодействия	

ных связей. Тепловая энергия молекул в водном растворе при 25 °С обычно имеет тот же порядок величины, что и энергия слабых взаимодействий, поэтому вероятность взаимодействия между растворенным веществом и растворителем (водой) практически такая же, как и взаимодействия между молекулами растворенного вещества. В связи с этим как водородные связи, так и ионные, гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия постоянно возникают и распадаются.

Хотя эти четыре типа взаимодействий по отдельности слабее ковалентной связи, суммарный эффект от действия множества взаимодействий такого рода может быть весьма значительным. Например, в нековалентном связывании фермента с субстратом могут быть задействованы как водородные связи, так и ионные, гидрофобные или ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Образование каждой из этих слабых связей вносит свой вклад в общее понижение свободной энергии системы. Можно рассчитать устойчивость нековалентного взаимодействия, например водородной связи между небольшой молекулой и макромолекулой,

исходя из энергии связи. Устойчивость, описываемая константой равновесия связи (см. ниже), экспоненциально зависит от энергии связи. Для диссоциации комплекса двух биомолекул (например, фермента и субстрата), связанных множеством слабых сил, необходимо, чтобы все эти взаимодействия были разрушены одновременно. Поскольку данные взаимодействия постоянно появляются и исчезают, одновременный разрыв всех связей маловероятен. Таким образом, молекулярная структура, удерживаемая с помощью 5–20 слабых взаимодействий, оказывается гораздо более устойчивой, чем могло бы показаться при формальном сложении небольших значений энергии связывания.

В таких макромолекулах, как белки, ДНК и РНК, имеется множество участков для образования водородных связей, гидрофобных, ионных и ван-дер-ваальсовых взаимодействий, так что суммарный эффект от действия этих слабых сил может быть огромным. Наиболее стабильная (т. е. нативная) структура макромолекул обычно характеризуется максимальным числом реализованных слабых взаимодействий. В соответствии с этим принципом происходит укладка полипептидной или полинуклеотидной цепи в присущую ей пространственную форму. Связывание антигенов и специфичных к ним антител также зависит от кумулятивного эффекта множества слабых взаимодействий. Как уже говорилось выше, именно энергия, высвобожденная

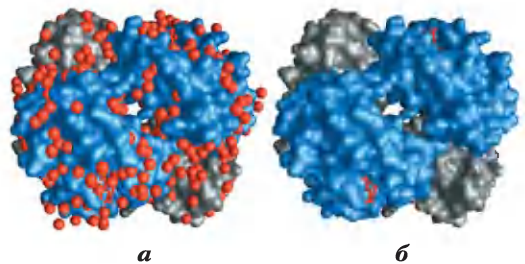


Рис. 2-9. Связывание воды с молекулой гемоглобина (PDB ID 1A3N). Кристаллическая структура молекулы гемоглобина *а*) со связанными молекулами воды (красные шарики) и *б*) без молекул воды. Молекулы воды настолько сильно связаны с белком, что при рентгеноструктурном анализе ведут себя так, как будто являются частью кристаллической структуры. Две α -субъединицы гемоглобина изображены серым, а две β -субъединицы — синим цветом. Каждая субъединица связана с гемом (структура из красных палочек; в данном ракурсе гем виден только в β -субъединицах). Структура и функции гемоглобина обсуждаются в гл. 5.

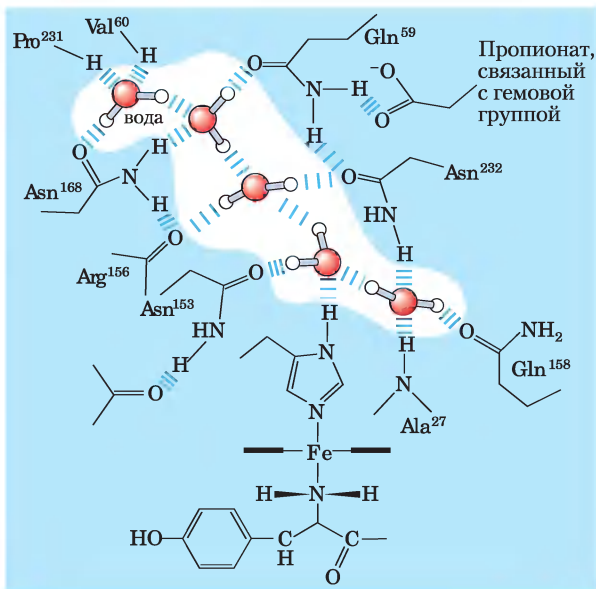


Рис. 2-10. Цепочка молекул воды в цитохроме *f*. Молекулы воды связываются в протонном канале мембранного белка цитохрома *f*, являющегося частью фотосинтетического аппарата в хлоропластах (рис. 19-64). Пять молекул воды связаны между собой и с функциональными группами белка водородными связями; в этом взаимодействии участвуют атомы основных цепей остатков валина, пролина, аргинина и аланина, а также атомы боковых цепей трех остатков аспарагина и двух остатков глутамина. Молекула белка связана с гемом (рис. 5-1), ион железа в котором облегчает перенос электронов в процессе фотосинтеза. Поток электронов сопряжен с процессом переноса протонов через мембрану, возможно, в соответствии с «прыжковым» механизмом переноса протонов по цепочке связанных молекул воды (рис. 2-13).

при нековалентном связывании фермента с субстратом, является движущей силой каталитической реакции. Связывание гормона или медиатора с клеточным рецептором — это тоже результат слабых взаимодействий. Из-за больших размеров молекул ферментов и рецепторов (по сравнению с их субстратами или лигандами) на их поверхности есть множество участков для реализации слабых взаимодействий. Комплементарность реагирующих макромолекул на молекулярном уровне означает возможность слабых взаимодействий между полярными, заряженными и гидрофобными группами на их поверхности.

При изучении структуры белков, например таких, как гемоглобин (рис. 2-9), методом рентгеноструктурного анализа (см. доп. 4-5, с. 196) часто вы-

ясняется, что молекулы воды связаны с белком настолько сильно, что ведут себя как часть кристаллической структуры. Аналогичное явление наблюдается и в кристаллах РНК или ДНК. Эти связанные молекулы воды, которые в водном растворе можно обнаружить методом ядерного магнитного резонанса, имеют совсем другие свойства, чем молекулы в толще воды. Например, они не обладают осмотической активностью (см. ниже). Связанные молекулы воды играют важную роль в функционировании многих белков. Так, в одной из основных реакций фотосинтеза под действием света протоны проникают сквозь биологическую мембрану по мере того, как электроны передаются в ряду специальных белков-переносчиков (рис. 19-60). Один из этих белков — цитохром *f* — имеет цепочку из пяти связанных молекул воды (рис. 2-10), которые могут обеспечивать перенос протонов через мембрану в соответствии с механизмом, названным «протонными прыжками» (см. ниже). Еще один подобный световой протонный насос — бактериородопсин, по-видимому, использует для трансмембранного переноса протонов цепочку связанных молекул воды, ориентированных определенным образом (рис. 19-67).

Растворенные вещества изменяют свойства воды

Любое растворенное вещество изменяет некоторые физические свойства растворителя (воды), в частности давление пара, температуру кипения, температуру плавления (замерзания) и осмотическое давление. Эти свойства называют **коллигативными свойствами**, поскольку в основе изменения всех свойств лежит одна и та же причина: концентрация воды в растворе ниже, чем в чистой воде. Изменение коллигативных свойств не зависит от химической природы растворенного вещества, а зависит только от *числа* частиц (молекул, ионов) в единице объема растворителя. Например, диссоциирующий в водном растворе NaCl изменяет осмотическое давление в два раза сильнее, чем такое же количество недиссоциирующей в воде глюкозы.

Молекулы воды стремятся переместиться из области с более высокой концентрацией воды в область с более низкой концентрацией — в соответствии со стремлением любой природной системы к разупорядочению. При разделении двух водных

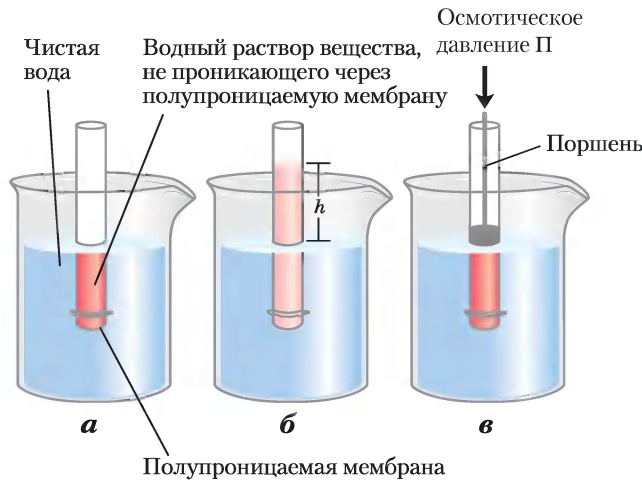


Рис. 2-11. Осмос и определение осмотического давления. а) Исходное состояние. В пробирке содержится водный раствор, а в стакане — чистая вода. Полупроницаемая мембрана пропускает воду, но не пропускает растворенное вещество. Вода течет из стакана в пробирку, стремясь сравнять концентрации воды по обе стороны мембраны. б) Конечное состояние. Вода проникла в раствор вещества, молекулы которого не могут проходить сквозь мембрану, в результате чего произошло разбавление раствора. В состоянии равновесия давление столба раствора, имеющего высоту h , уравновешивает осмотическое давление, характеризующее стремление воды проникнуть в зону с более низкой концентрацией. в) Осмотическое давление (Π) определяется как сила, которую нужно приложить к поршню, чтобы снизить уровень раствора в пробирке до уровня воды в стакане. Эта сила пропорциональна высоте столба жидкости (h) в пробирке в состоянии (б).

растворов с разной концентрацией растворенных веществ с помощью полупроницаемой мембраны (позволяющей проходить молекулам воды, но не пропускающей растворенные вещества) молекулы воды диффундируют из области с большей концентрацией воды в область с меньшей концентрацией, оказывая осмотическое давление (рис. 2-11). Осмотическое давление (Π) определяется как сила, которую нужно приложить для оказания сопротивления движению воды (рис. 2-11, в), и рассчитывается по уравнению Вант-Гоффа:

$$\Pi = icRT$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура. Множитель ic , являющийся произведением молярной концентрации раствора (c) и фактора Вант-Гоффа (i), называется **осмолярностью** раствора и отражает степень диссоциации растворенного вещества на ионы. В разбавленном растворе NaCl происходит полная диссоциация соли на ионы Na^+ и Cl^- , что удваивает число частиц растворенного вещества, т. е. $i = 2$. Для всех недиссоциирующих веществ $i = 1$. Осмотическое давление

в растворе нескольких (n) веществ представляет собой сумму осмотических давлений, оказываемых каждым растворенным веществом:

$$\Pi = RT(i_1c_1 + i_2c_2 + \dots + i_nc_n)$$

Явление **осмоса**, проявляющееся в движении воды через полупроницаемую мембрану под действием разности осмотических давлений, играет важнейшую роль в жизни большинства клеток. Плазматические мембраны клеток гораздо лучше проницаемы для воды, чем для большинства других небольших молекул, ионов и макромолекул. Проникновение воды в клетку частично происходит путем обычной диффузии молекул воды сквозь двойной липидный слой, а частично связано с наличием в мембране белковых каналов (так называемых аквапоринов, см. рис. 11-46), обеспечивающих селективный транспорт воды. Растворы с осмолярностью, равной осмолярности цитоплазмы клетки, называют **изотоническими** по отношению к клетке. Количество воды в клетке, помещенной в изотонический раствор, не уменьшается и не увеличивается (рис. 2-12).

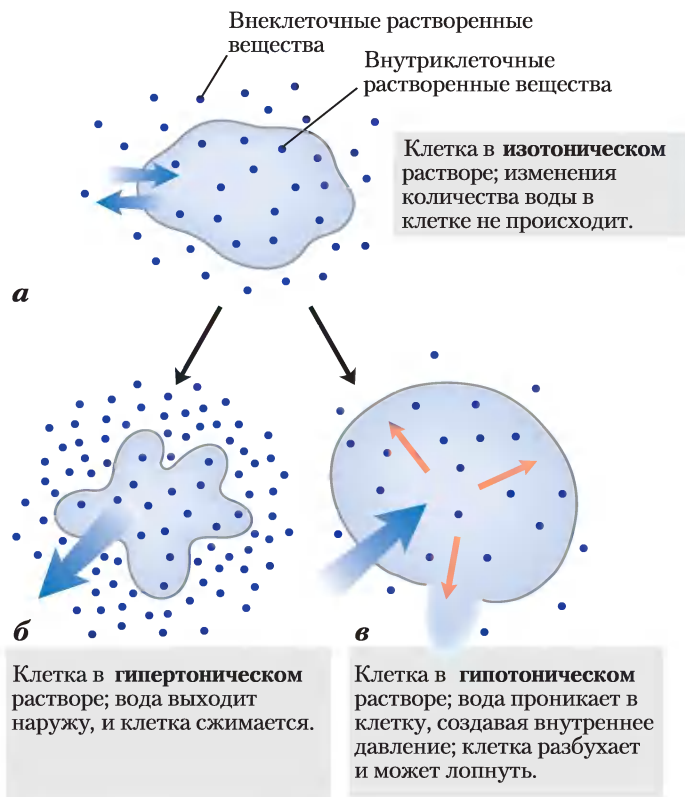


Рис. 2-12. Влияние осмолярности внешней среды на движение воды через плазматическую мембрану. Если клетку, находящуюся в осмотическом равновесии с окружающей средой (т. е. находящуюся в изотоническом растворе) (*а*), перенести в гипертонический (*б*) или гипотонический раствор (*в*), то вода начнет проходить сквозь плазматическую мембрану, стремясь уравновесить осмолярность внутри клетки и в окружающей среде.

В **гипертоническом** растворе, осмолярность которого превышает осмолярность цитозоля, клетки сжимаются, поскольку вода из них выходит. Напротив, в **гипотоническом** растворе, осмолярность которого ниже осмолярности цитозоля, клетки разбухают, поскольку в них усиленно проникает вода. В естественных условиях концентрация биомолекул и ионов в клетках обычно выше, чем в окружающей среде, так что под действием осмотического давления вода должна была бы проникать в клетки. Если не противостоять этому давлению, прибывающая вода будет растягивать плазматическую мембрану и в конечном итоге разорвет клетку (осмотический лизис).

У клеток есть несколько механизмов для предотвращения подобной катастрофы. Плазматическая мембрана клеток бактерий и растений окружена нерастяжимой клеточной стенкой, име-

ющей достаточную жесткость и прочность, чтобы противостоять осмотическому давлению и не допустить осмотического лизиса. Некоторые пресноводные простейшие, обитающие в условиях гипотонической среды, имеют специальные органеллы — сократительные вакуоли, которые выкачивают из клетки воду. У многоклеточных животных плазма крови и интерстициальная жидкость (межклеточная жидкость тканей) имеют осмолярность, близкую к осмолярности цитозоля. Значительный вклад в осмолярность плазмы крови вносит высокая концентрация альбумина и других белков. Кроме того, для поддержания осмотического равновесия с окружающей средой клетки активно выкачивают в интерстициальную жидкость Na^+ и некоторые другие ионы.

Поскольку влияние растворенных веществ на осмолярность зависит от *числа* частиц в рас-

творе, а не от их *массы*, макромолекулы (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды) оказывают гораздо меньшее действие, чем составляющие их мономерные молекулы в эквивалентном по массе количестве. Например, один *грамм* полисахарида, состоящего из 1000 остатков глюкозы, оказывает такое же влияние на осмолярность, как один *миллиграмм* глюкозы. Энергетические запасы клетки хранятся в виде полисахаридов (крахмала или гликогена), а не глюкозы или других простых сахаров, что позволяет избежать опасного повышения осмотического давления в запасующей клетке.

В растениях осмотическое давление служит для поддержания механической прочности. Вода поступает в клетки растений благодаря очень высокой концентрации растворенных веществ в клеточной вакуоли (рис. 2-12). Возникающее в ре-

зультате этого осмотическое давление на клеточную стенку (тургорное давление), возрастая, придает жесткость клеткам, тканям и всему растению в целом. Зелень в приготовленном салате вянет, поскольку потеря воды приводит к снижению тургора. Явление осмоса важно учитывать и в лабораторной практике. Например, митохондрии, хлоропласты и лизосомы ограничены полупроницаемыми мембранами. Выделение органелл из разрушенных клеток должно осуществляться в изотоническом растворе (см. рис. 1-8), что позволит избежать проникновения в органеллы избыточного количества воды, сопровождающегося их набуханием и разрушением. В буферах, используемых при фракционировании клеток, обычно содержится достаточная концентрация сахарозы или других инертных веществ, предохраняющих органеллы от осмотического лизиса.

■ Пример 2-1 ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ В ОРГАНЕЛЛЕ. I

Предположим, что основными растворенными веществами в интактных лизосомах являются KCl (~0,1 М) и NaCl (~0,03 М). Какой должна быть концентрация сахарозы в растворе для экстракции лизосом при комнатной температуре (25 °С), чтобы предотвратить их набухание и лизис?

Решение. Нужно найти концентрацию сахарозы, обеспечивающую такое же осмотическое давление, какое создают KCl и NaCl, присутствующие в лизосомах. Для расчета осмотического давления воспользуемся уравнением Вант-Гоффа:

$$\Pi = RT(i_1c_1 + i_2c_2 + i_3c_3 + \dots + i_n c_n)$$

где R — универсальная газовая постоянная (8,315 Дж/моль·К), T — абсолютная температура (в кельвинах), c_1 , c_2 и c_3 — молярные концентрации растворенных веществ, а i_1 , i_2 и i_3 — число частиц, которое образуется в растворе каждого вещества ($i = 2$ для KCl и NaCl).

Рассчитаем осмотическое давление в лизосоме:

$$\begin{aligned} \Pi_{\text{лизосома}} &= RT(i_{\text{KCl}}c_{\text{KCl}} + i_{\text{NaCl}}c_{\text{NaCl}}) = \\ &= RT[(2)(0,03 \text{ моль/л}) + (2)(0,1 \text{ моль/л})] = RT(0,26 \text{ моль/л}) \end{aligned}$$

Поскольку концентрации растворенных веществ известны лишь с точностью до одного знака после запятой, получаем $\Pi_{\text{лизосома}} = RT(0,3 \text{ моль/л})$.

Осмотическое давление раствора сахарозы определяется по формуле:

$$\Pi_{\text{сахароза}} = RT(i_{\text{сахароза}} c_{\text{сахароза}})$$

В данном случае $i_{\text{сахароза}} = 1$, поскольку сахароза в воде не диссоциирует. Таким образом,

$$\Pi_{\text{сахароза}} = RT c_{\text{сахароза}}$$

Приравниваем осмотическое давление содержимого лизосом осмотическому давлению раствора сахарозы:

$$\begin{aligned} \Pi_{\text{сахароза}} &= \Pi_{\text{лизосома}} \\ RT(c_{\text{сахароза}}) &= RT(0,3 \text{ моль/л}) \\ c_{\text{сахароза}} &= 0,3 \text{ моль/л} \end{aligned}$$

Таким образом, требуемая концентрация сахарозы ($M_{\text{сахароза}} = 342$) составляет $(0,3 \text{ моль/л})(342 \text{ г/моль}) = 102,6 \text{ г/л}$, или $c_{\text{сахароза}} = 0,1 \text{ кг/л}$.

■ Пример 2-2 ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ В ОРГАНЕЛЛЕ. II

Предположим, что для уравнивания осмотического давления внутри лизосом (см. пример 2-1) мы решили использовать раствор полисахарида, например гликогена. Считая, что этот линейный полимер состоит из 100 глюкозных звеньев, рассчитайте количество гликогена, необходимое для достижения того же осмотического давления, что и в примере 2-1. M_r гликогена, состоящего из остатков глюкозы, $\sim 18\,000$, и, как и сахароза, в воде он не диссоциирует.

Решение. Мы получили в примере 2-1:

$$\Pi_{\text{сахароза}} = RT(0,3 \text{ моль/л})$$

Аналогичным образом,

$$\Pi_{\text{гликоген}} = RT(i_{\text{гликоген}} c_{\text{гликоген}}) = RT(c_{\text{гликоген}})$$

Для раствора гликогена с тем же осмотическим давлением, что и в растворе сахарозы, можно записать:

$$\begin{aligned} \Pi_{\text{гликоген}} &= \Pi_{\text{сахароза}} \\ RT(c_{\text{гликоген}}) &= RT(0,3 \text{ моль/л}) \\ c_{\text{гликоген}} &= 0,3 \text{ моль/л} = (0,3 \text{ моль/л})(18\,000 \text{ г/моль}) = 5,4 \text{ кг/л} \end{aligned}$$

$c_{\text{гликоген}} = 5 \text{ кг/л}$. Это невероятно высокая концентрация!

Как мы увидим позднее (с. 353), клетки печени и мышц запасают углеводы не в виде низкомолекулярных сахаров, таких как глюкоза или сахароза, но в виде высокомолекулярного гликогена, что позволяет минимизировать влияние на осмолярность цитозоля.

Краткое содержание раздела 2.1. СЛАБЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ВОДНЫХ СРЕДАХ

- Большое различие электроотрицательности атомов Н и О является причиной сильной полярности молекулы воды, благодаря чему она образует водородные связи с другими молекулами воды, а также с молекулами растворенных

веществ. Водородные связи постоянно рвутся и вновь образуются, имеют в основном электростатическую природу и по прочности слабее ковалентных связей. Вода — хороший растворитель для полярных (гидрофильных) веществ, с которыми она образует водородные связи, и для заряженных веществ, с которыми она вступает в электростатические взаимодействия.

■ Неполярные (гидрофобные) вещества плохо растворяются в воде и не способны образовывать водородные связи с растворителем. При наличии в водном растворе гидрофобных веществ происходит энергетически невыгодное упорядочение молекул воды на их поверхности. Для минимизации обращенной к воде поверхности неполярные вещества, такие как липиды, образуют агрегаты (мицеллы) таким образом, что гидрофобные остатки молекул обращены внутрь мицелл, а полярные группы реагируют с водой. Силы, заставляющие гидрофобные частицы удерживаться вместе в растворе полярного растворителя, называют гидрофобными взаимодействиями.

■ Многочисленные слабые нековалентные взаимодействия играют важную роль в образовании нативной конформации таких макромолекул, как белки и нуклеиновые кислоты. Наиболее устойчивая конформация биомолекулы характеризуется реализацией максимального числа водородных связей внутри самой молекулы, а также между молекулой и растворителем. При этом гидрофобные остатки образуют кластеры внутри биомолекулы, в результате чего их контакт с водой оказывается минимальным.

■ Физические свойства водных растворов сильно зависят от концентрации растворенных веществ. Если два водных раствора разделены полупроницаемой мембраной (такой как плазматическая мембрана, отделяющая клетку от окружающей среды), вода стремится пройти сквозь мембрану и сравнять осмолярность двух растворов. Давление, оказываемое при этом водой, называют осмотическим давлением.

2.2. Диссоциация воды. Слабые кислоты и слабые основания

Многие свойства воды в качестве растворителя можно объяснить, рассматривая H_2O как незаряженную молекулу. Однако иногда необходимо учитывать диссоциацию молекул воды и наличие в воде ионов водорода H^+ и гидроксиль-

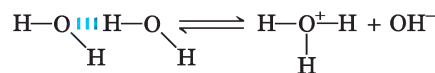
ных ионов OH^- . Диссоциация воды как любая обратимая реакция характеризуется константой равновесия. При растворении в воде слабых кислот они диссоциируют — в воде появляются дополнительные ионы H^+ ; слабые основания присоединяют H^+ и переходят в протонированную форму. Каждый из этих процессов характеризуется константой равновесия. Общая концентрация ионов водорода определяется экспериментально и выражается как pH раствора. Чтобы предсказать, что будет происходить в растворе, необходимо знать константы равновесия соответствующих реакций диссоциации. Поэтому далее мы рассмотрим равновесия при диссоциации воды, а также слабых кислот и оснований в водном растворе.

В чистой воде мало ионов

Молекулы воды имеют небольшую склонность к диссоциации, т. е. к образованию ионов водорода (протона) и гидроксила в соответствии со следующим уравнением:



Обычно мы представляем продукт диссоциации воды как H^+ , однако следует иметь в виду, что свободных протонов в воде не существует. Ионы водорода в воде немедленно гидратируются, т. е. превращаются в **ион гидроксония** (гидрония) H_3O^+ . Благодаря наличию водородных связей между молекулами воды гидратация протонов происходит практически мгновенно:



Степень диссоциации воды можно определить по ее электрической проводимости. Чистая вода проводит электричество, поскольку H_3O^+ движется к катоду, а OH^- — к аноду. Движение этих ионов в электрическом поле отличается исключительной быстротой по сравнению с такими ионами, как Na^+ , K^+ или Cl^- . Такую высокую подвижность можно объяснить, учитывая механизм передачи протона, изображенный на **рис. 2-13**. Дело в том, что не один конкретный протон передвигается в толще воды на дальние расстояния, а целая «армия» протонов переносит заряд между соседними, связанными водородными связями молекулами воды; суммар-

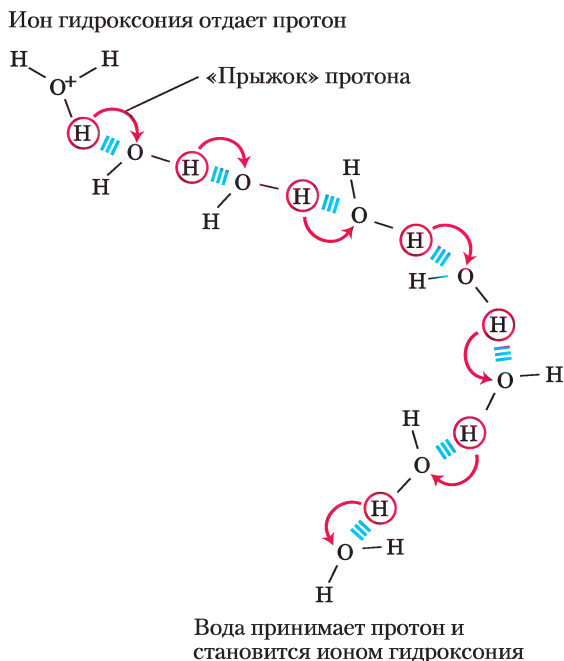


Рис. 2-13. Механизм «протонных прыжков». Своеобразные «прыжки» протонов между соседними связанными водородной связью молекулами воды очень сильно увеличивают общую скорость переноса протона на достаточно большие расстояния. Как только ион гидроксония (*наверху слева*) отдает свой протон, практически сразу молекула воды, находящаяся от него на некотором расстоянии (*внизу справа*), принимает протон и сама становится ионом гидроксония. Скорость передачи протона в соответствии с таким механизмом оказывается намного выше скорости диффузии и объясняет удивительно высокую подвижность протона по сравнению с подвижностью других одновалентных катионов, таких как Na^+ или K^+ .

ный эффект этого состоит в переносе протона на дальнее расстояние за удивительно короткое время. Благодаря столь высокой подвижности H^+ (а также OH^- , который перемещается так же быстро, только в противоположном направлении) кислотно-основные реакции в водных растворах обычно протекают с очень высокими скоростями. Как отмечалось выше, такой механизм переноса протона играет, по всей видимости, очень важную роль в биологических процессах (рис. 2-10; см. также рис. 19-67).

Поскольку обратимая реакция диссоциации воды имеет очень важное значение для понимания роли воды в функционировании клеток, не-

обходимо знать способы количественного выражения степени ионизации. Рассмотрим кратко некоторые общие свойства обратимых химических реакций.

Равновесие любой химической реакции характеризуется **константой равновесия** K_{eq} , часто обозначаемой просто K . Константу равновесия химической реакции



можно выразить через концентрации реагирующих веществ (A и B) и продуктов реакции (C и D) в соответствии с уравнением:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{C}]_{\text{eq}}[\text{D}]_{\text{eq}}}{[\text{A}]_{\text{eq}}[\text{B}]_{\text{eq}}}$$

Строго говоря, в уравнении должны стоять *активности* (эффективные концентрации в неидеальных растворах) каждого вещества. Однако, за исключением отдельных, очень точных экспериментов, константу равновесия можно оценить, измеряя *равновесные концентрации* веществ. Константа равновесия — безразмерная величина, но следует помнить, что для ее определения в уравнение подставляют значения концентраций веществ, выраженные в молях.

Константа равновесия служит количественной характеристикой химической реакции при данной температуре. Она позволяет вычислить состав равновесной смеси независимо от количеств исходных веществ и образующихся продуктов. И наоборот, если известны концентрации всех исходных веществ и конечных продуктов в состоянии равновесия, то для реакции, протекающей при данной температуре, можно легко вычислить константу равновесия. Как мы показали в гл. 1, логарифм константы равновесия связан с изменением свободной энергии Гиббса ΔG° .

Диссоциацию воды можно охарактеризовать величиной константы равновесия

Диссоциация воды в соответствии с уравнением 2-1 протекает лишь в незначительной степени; в любой конкретный момент при 25°C лишь две из 10^9 молекул воды распадаются на ионы. Константу равновесия обратимой реакции (2-1) можно записать как

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]} \quad (2-3)$$

В чистой воде при 25 °С концентрация воды составляет 55,5 М (эту величину получают, разделив массу 1 л воды (в граммах) на молярную массу воды: $(1000 \text{ г/л}) / (18,015 \text{ г/моль}) = 55,5 \text{ М}$). Эту величину можно считать практически постоянной по сравнению с гораздо более низкими концентрациями H^+ и OH^- , составляющими $1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$. Таким образом, значение 55,5 М можно подставить в уравнение 2-3, в результате чего получаем:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{55,5 \text{ М}}$$

или

$$(55,5 \text{ М}) K_{\text{eq}} = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = K_w \quad (2-4)$$

где K_w представляет собой произведение $55,5 \cdot K_{\text{eq}}$ и называется **ионным произведением воды** при 25 °С.

По электропроводности чистой воды при 25 °С было найдено $K_{\text{eq}} = 1,8 \cdot 10^{-16}$. Подстановкой этой величины в уравнение 2-4 получаем численное значение ионного произведения воды:

$$\begin{aligned} K_w &= [\text{H}^+][\text{OH}^-] = (55,5 \text{ М}) (1,8 \cdot 10^{-16} \text{ М}) = \\ &= 1,0 \cdot 10^{-14} \text{ М}^2 \end{aligned}$$

Это означает, что в водном растворе при 25 °С произведение $[\text{H}^+][\text{OH}^-]$ всегда равно $1 \cdot 10^{-14} \text{ М}^2$. В чистой воде концентрации ионов равны $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-]$. Этот раствор называется нейтральным (**нейтральное значение pH**). Можно рассчитать концентрации H^+ и OH^- в нейтральном растворе, пользуясь значением ионного произведения воды:

$$\begin{aligned} K_w &= [\text{H}^+][\text{OH}^-] = [\text{H}^+]^2 = [\text{OH}^-]^2 \\ [\text{H}^+] &= \sqrt{K_w} = \sqrt{1 \cdot 10^{-14} \text{ М}^2} \\ [\text{H}^+] &= [\text{OH}^-] = 10^{-7} \text{ М} \end{aligned}$$

Так как ионное произведение воды является постоянной величиной, очевидно, что если концентрация ионов H^+ превышает $1 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, то концентрация ионов OH^- должна быть меньше этой величины, и наоборот. Когда концентрация H^+ очень высокая, как, например, в соля-

ной кислоте, концентрация OH^- должна быть очень низкой, поскольку их произведение — постоянная величина. Таким образом, используя ионное произведение воды, можно вычислить концентрацию H^+ , если известна концентрация OH^- , и наоборот.

Пример 2-3 РАСЧЕТ $[\text{H}^+]$

Какова концентрация ионов H^+ в 0,1 М растворе NaOH?

Решение. Запишем ионное произведение воды:

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$$

Решая это уравнение относительно $[\text{H}^+]$, получаем для $[\text{OH}^-] = 0,1 \text{ М}$

$$\begin{aligned} [\text{H}^+] &= \frac{K_w}{[\text{OH}^-]} = \frac{1 \cdot 10^{-14} \text{ М}^2}{0,1 \text{ М}} = \frac{10^{-14} \text{ М}^2}{10^{-1} \text{ М}} \\ &= 10^{-13} \text{ М} \end{aligned}$$

Пример 2-4 РАСЧЕТ $[\text{OH}^-]$

Какова концентрация OH^- в растворе, содержащем $1,3 \cdot 10^{-4} \text{ М}$ H^+ ?

Решение. Запишем ионное произведение воды:

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$$

Решая это уравнение относительно $[\text{OH}^-]$, получаем для $[\text{H}^+] = 1,3 \cdot 10^{-4}$

$$\begin{aligned} [\text{OH}^-] &= \frac{K_w}{[\text{H}^+]} = \frac{1 \cdot 10^{-14} \text{ М}^2}{0,00013 \text{ М}} = \frac{10^{-14} \text{ М}^2}{1,3 \cdot 10^{-4} \text{ М}} \\ &= 7,7 \cdot 10^{-11} \text{ М} \end{aligned}$$

При решении этих или любых других уравнений округляйте результат до необходимого числа значащих цифр, как показано здесь.

Шкала pH: обозначения концентраций ионов H^+ и OH^-

Шкала pH составлена на основе ионного произведения воды K_w (табл. 2-6). Она представляет собой удобный способ обозначения концентраций H^+ , а следовательно, и ионов OH^- , в любом

Таблица 2-6		Шкала pH	
$[H^+]$ (М)	pH	$[OH^-]$ (М)	pOH*
10^0 (1)	0	10^{-14}	14
10^{-1}	1	10^{-13}	13
10^{-2}	2	10^{-12}	12
10^{-3}	3	10^{-11}	11
10^{-4}	4	10^{-10}	10
10^{-5}	5	10^{-9}	9
10^{-6}	6	10^{-8}	8
10^{-7}	7	10^{-7}	7
10^{-8}	8	10^{-6}	6
10^{-9}	9	10^{-5}	5
10^{-10}	10	10^{-4}	4
10^{-11}	11	10^{-3}	3
10^{-12}	12	10^{-2}	2
10^{-13}	13	10^{-1}	1
10^{-14}	14	10^0 (1)	0

* Иногда по аналогии с pH используют pOH. По определению, $pOH = -\lg[OH^-]$. Заметьте, что всегда $pH + pOH = 14$.

водном растворе в интервале между $1,0 \text{ M } H^+$ и $1,0 \text{ M } OH^-$. Что же такое pH?

$$pH = \lg \frac{1}{[H^+]} = -\lg [H^+]$$

где символ «p» означает отрицательный логарифм. Можно рассчитать pH нейтрального раствора при 25°C , в котором $[H^+] = 1 \cdot 10^{-7}$:

$$pH = \lg \frac{1}{1,0 \cdot 10^{-7}} = 7,0$$

Обратите внимание на то, что концентрация протонов должна быть выражена в молях (M).

В случае нейтрального раствора $pH = 7$, и это не произвольно выбранное значение, а результат, полученный из ионного произведения воды при 25°C , причем целое число получено расчетным путем. Растворы с $pH > 7$ — щелочные, поскольку в них концентрация OH^- больше концентрации H^+ , растворы с $pH < 7$ — кислые.

Важно понимать, что шкала pH логарифмическая. Если величины pH двух растворов различаются на 1, это означает, что концентрация H^+ в одном растворе в 10 раз выше, чем в другом, при этом мы можем и не знать численных значений

pH этих растворов. На рис. 2-14 приведены pH некоторых жидкостей. Заметьте, что концентрация ионов H^+ в кока-коле (pH 3,0) или красном вине (pH 3,7) примерно в 10 000 раз выше, чем в крови (pH 7,4).

Для приблизительной оценки pH водного раствора используют различные красители (индикаторы), например лакмус, фенолфталеин или феноловый красный, которые изменяют цвет при изменении pH. Измерение pH в химической или клинической лаборатории осуществляют стеклянными электродами, которые селективны к ионам H^+ , но не реагируют на присутствие в растворе ионов Na^+ , K^+ и других катионов. Значения pH растворов измеряют на pH-метре. При измерениях необходимы два электрода — стеклянный электрод и электрод сравнения.



Измерение pH является одной из наиболее важных и часто используемых в биохимии процедур, поскольку от pH зависит структура и

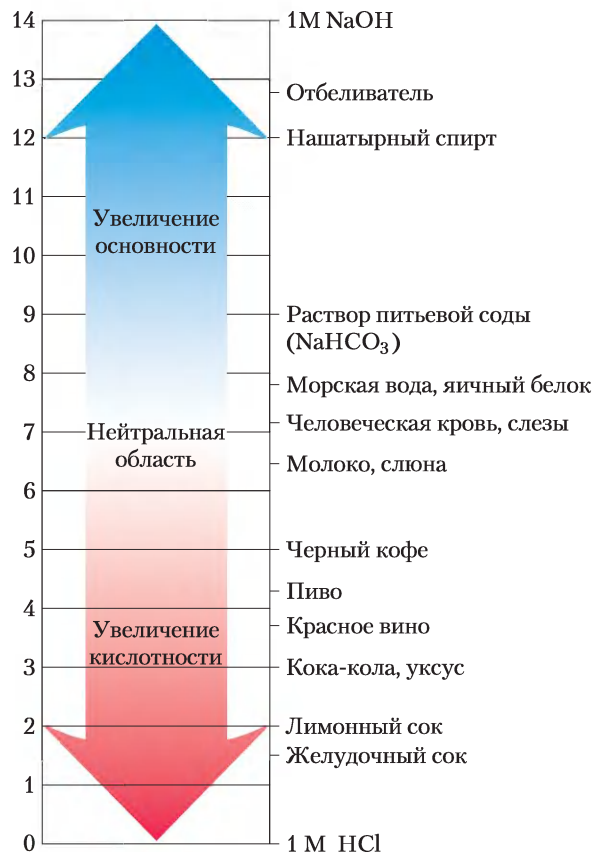


Рис. 2-14. pH (шкала pH слева) некоторых жидкостей.

функции многих биологических макромолекул, в частности каталитическая активность ферментов (рис. 2-21). Измерения рН крови и мочи — это рутинные процедуры, постоянно используемые в медицинской диагностике. Например, у людей, страдающих тяжелой формой диабета, значение рН крови часто снижено по сравнению с нормальным значением 7,4. Такое состояние носит название **ацидоза** (ниже оно описано более детально). При некоторых других заболеваниях рН крови может быть выше нормы; такое состояние называется **алкалозом**. Случаи сильного ацидоза или алкалоза опасны для жизни. ■

Слабые кислоты и основания характеризуют константами диссоциации

Соляная, серная и азотная кислоты, называемые обычно сильными кислотами, полностью диссоциируют в разбавленных водных растворах. Сильные основания NaOH и KOH в водных растворах также полностью диссоциируют. Однако для биохимии более важное значение имеют слабые кислоты и основания — те, которые в водных растворах не диссоциируют полностью. Они встречаются почти во всех биологических системах и принимают активное участие в ме-

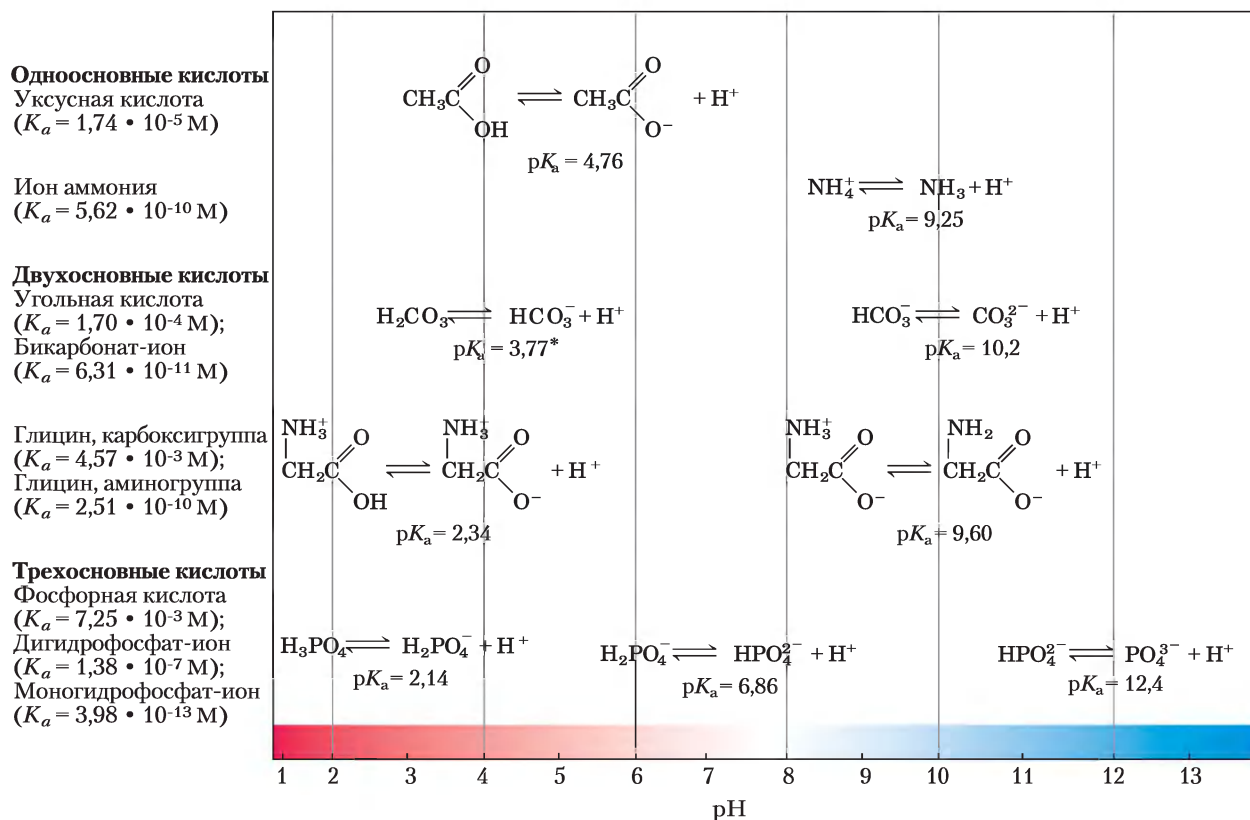
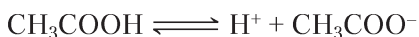


Рис. 2-15. Акцептор и донор протона составляют сопряженную кислотно-основную пару.

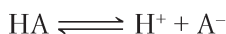
Некоторые соединения, такие как уксусная кислота или ион аммония, являются одноосновными, т. е. при диссоциации могут отщепить лишь один протон. Существуют также двухосновные (угольная кислота (H_2CO_3) или глицин) и трехосновные кислоты (например, фосфорная кислота (H_3PO_4)). Реакции диссоциации для нескольких сопряженных кислотно-основных пар, показанных на рисунке, расположены в соответствии с градиентом рН. Для каждой реакции приведены константы диссоциации (K_a) и показатели их отрицательных логарифмов (pK_a). Значения pK_a угольной кислоты H_2CO_3 при двухступенчатой диссоциации объяснены на с. 99.

табализме и его регуляции. Поведение водных растворов слабых кислот и оснований легче понять, если сначала познакомиться с некоторыми определениями.

Кислоты можно определить как доноры протонов, а основания — как акцепторы протонов. Донор протона и соответствующий акцептор образуют **сопряженную кислотно-основную пару** (рис. 2-15). Примером сопряженной кислотно-основной пары являются уксусная кислота (CH_3COOH — донор протона) и ацетат-анион (CH_3COO^- — акцептор протона). Они связаны следующей обратимой реакцией:



Характерная особенность каждой кислоты состоит в том, что в воде она теряет свой протон. Чем сильнее кислота, тем сильнее выражена эта тенденция. Способность любой кислоты HA отщеплять протон и образовывать сопряженное основание A^- характеризуется константой равновесия (K) обратимой реакции



где

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = K_a$$

Константу равновесия этой реакции обычно называют **константой ионизации** или **константами диссоциации кислоты**. Численные значения констант диссоциации некоторых кислот представлены на рис. 2-15. Более сильные кислоты, такие как фосфорная или угольная кислоты, имеют более высокие константы диссоциации, тогда как более слабые кислоты, такие как анион HPO_4^{2-} , характеризуются более низкими значениями констант.

На рис. 2-15 приводятся также значения $\text{p}K_a$, которые по аналогии с pH определяются в соответствии с уравнением:

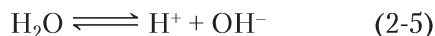
$$\text{p}K_a = \lg(1/K_a) = -\lg K_a$$

Чем сильнее способность соединения отдавать протон, тем более сильной кислотой оно является и тем более низкое значение $\text{p}K_a$ ему соответствует. Как мы увидим далее, численное значение $\text{p}K_a$ слабых кислот довольно легко определить.

Значения $\text{p}K_a$ слабых кислот можно определить из кривых титрования

Для определения количества кислоты в данном растворе проводят титрование. Для этого к точно отмеренному объему раствора кислоты добавляют раствор сильного основания (обычно едкого натра NaOH) с известной концентрацией. Раствор основания добавляют маленькими порциями до тех пор, пока не произойдет нейтрализация кислоты, что устанавливают по показаниям pH -метра или по изменению окраски индикатора. Концентрацию кислоты в анализируемом растворе можно определить исходя из объема и концентрации добавленного раствора NaOH .

График, отражающий зависимость pH титруемого раствора от концентрации добавленного основания, называется **кривой титрования**. Из этого графика можно определить величину $\text{p}K_a$ слабой кислоты. Проследим за ходом титрования 0,1 М раствора уксусной кислоты (для простоты обозначим ее здесь как HAc) с помощью 0,1 М раствора NaOH при 25 °С (рис. 2-16). Процесс включает в себя две обратимые реакции:



Эти реакции характеризуются соответствующими константами равновесия:

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 1 \cdot 10^{-14} \text{ M}^2 \quad (2-7)$$

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{Ac}^-]}{[\text{HAc}]} = 1,74 \cdot 10^{-5} \text{ M} \quad (2-8)$$

В начале титрования, до добавления NaOH , уксусная кислота уже слегка диссоциирует, причем степень ее диссоциации можно определить, зная константу диссоциации (уравнение 2-8).

По мере добавления NaOH ионы OH^- соединяются со свободными ионами H^+ и образуют молекулы воды. При этом концентрации обоих ионов в растворе должны постоянно соответствовать значению ионного произведения воды (уравнение 2-7). Как только свободные ионы H^+ оказываются связанными, уксусная кислота HAc диссоциирует в соответствии с собственной константой диссоциации (уравнение 2-8). В результате по мере добавления щелочи concentra-

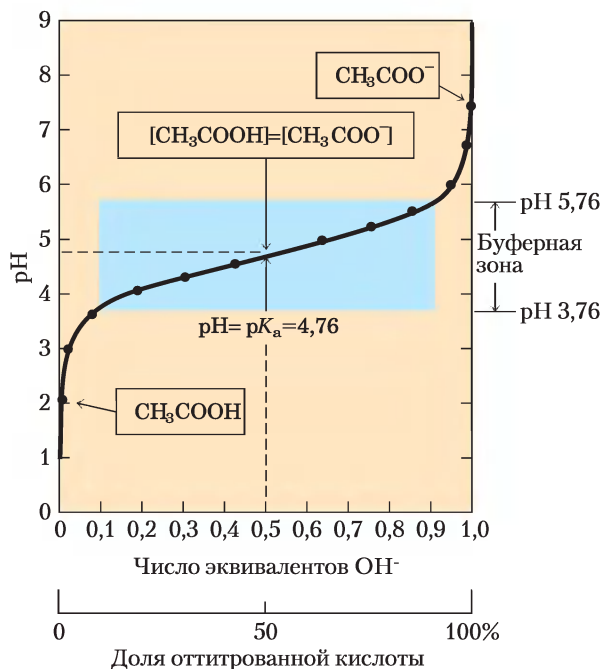


Рис. 2-16. Кривая титрования уксусной кислоты. После добавления каждой порции NaOH к раствору уксусной кислоты измеряют значение pH. Эту величину откладывают по оси ординат, тогда как по оси абсцисс откладывают долю общего количества NaOH , требуемого для превращения всей уксусной кислоты в депротонированную форму, т. е. в ацетат. По полученным точкам проводят кривую титрования. В рамках указаны преобладающие ионные формы уксусной кислоты при соответствующих значениях pH. В средней точке кривой титрования концентрации донора и акцептора протонов равны, а значение pH в этой точке численно равно значению pK_a . Зона, выделенная голубым цветом, соответствует буферной зоне системы (когда ионизовано от 10 до 90% титруемой уксусной кислоты).

ция HAc постоянно уменьшается, а концентрация аниона Ac^- увеличивается. В средней точке титрования, точно соответствующей добавлению 0,5 моль эквивалентов NaOH , половина исходной кислоты находится в диссоциированной форме, а это значит, что концентрация донора протона HAc становится равной концентрации акцептора Ac^- . В этой точке соблюдается очень важное соотношение: значение pH раствора, содержащего равные молярные концентрации уксусной кислоты и иона ацетата, а именно 4,76, точно равно значению pK_a уксусной кислоты (сравните значения на рис. 2-15 и 2-16). Скоро

нам станет ясен смысл этого соотношения, которое соблюдается для всех слабых кислот.

По мере того как мы продолжаем титрование, добавляя новые порции NaOH , оставшаяся недиссоциированная кислота постепенно превращается в ацетат. Конечная точка титрования наблюдается около pH 7,0: вся уксусная кислота передала свои протоны анионам OH^- , в результате чего образовались вода и ацетат. На протяжении всего процесса титрования существуют два взаимосвязанных равновесия (уравнения 2-5 и 2-6), каждое из которых характеризуется своей константой равновесия.

На рис. 2-17 сравниваются кривые титрования трех слабых кислот с сильно различающимися константами диссоциации: уксусной кислоты

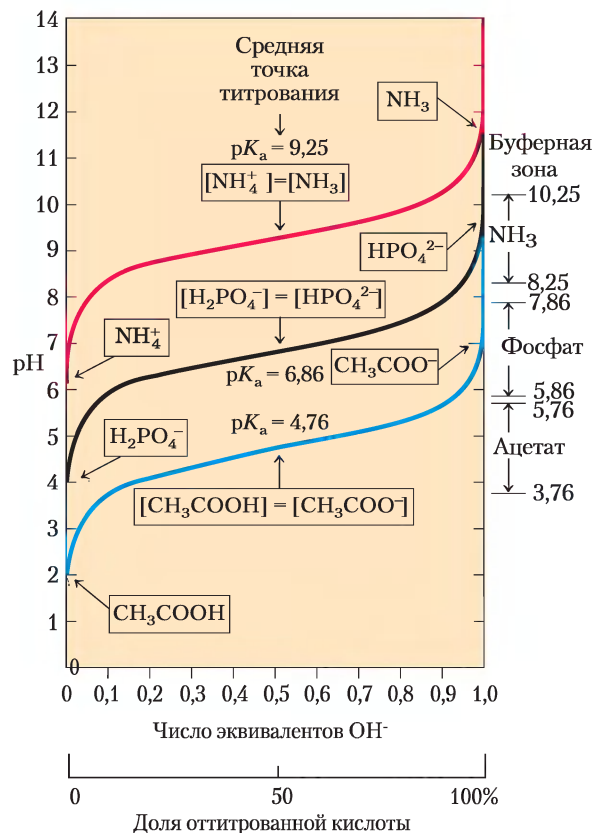


Рис. 2-17. Сравнение кривых титрования трех слабых кислот: CH_3COOH , H_2PO_4^- и NH_4^+ . В рамках указаны преобладающие ионные формы этих соединений при соответствующих значениях pH. Справа указаны соответствующие буферные зоны. Сопряженные кислотно-основные пары являются эффективными буферными системами при тех значениях pH, при которых доноры протонов ионизованы на 10–90%.

($pK_a = 4,76$), дигидрофосфат-иона ($pK_a = 6,86$) и иона аммония ($pK_a = 9,25$). Кривые титрования этих кислот имеют одинаковую форму, но соответствуют разным значениям pH, поскольку кислоты различаются по силе. Уксусная кислота имеет наиболее высокое значение K_a (самое маленькое pK_a) и является самой сильной из этих трех слабых кислот (легче других отдает свой протон); при pH 4,76 она уже наполовину диссоциирована. Дигидрофосфат отдает протон труднее; он диссоциирован наполовину при pH 6,86. Самой слабой из трех кислот является ион аммония, он диссоциирует на 50% лишь при pH 9,25.

Самый важный вывод, который можно сделать на основании кривых титрования слабых кислот, состоит в том, что характер этих кривых указывает на возможность использования слабых кислот и их анионов в качестве буферов, которые будут описаны далее.

Краткое содержание раздела 2.2.

ДИССОЦИАЦИЯ ВОДЫ. СЛАБЫЕ КИСЛОТЫ И СЛАБЫЕ ОСНОВАНИЯ

- Чистая вода — слабый электролит; в ней содержатся равные количества ионов водорода (ионов гидроксония H_3O^+) и гидроксид-ионов. Диссоциация воды характеризуется константой равновесия $K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}$. Из этого выражения можно вывести значение ионного произведения воды (K_w). При 25 °C $K_w = [H^+][OH^-] = 55,5K = 10^{-14} M^2$.
- Значение pH водного раствора отражает концентрацию ионов водорода в логарифмических единицах: $pH = \lg(1/[H^+]) = -\lg[H^+]$.
- Чем выше кислотность раствора, тем ниже его pH. Слабые кислоты частично диссоциируют с высвобождением иона водорода, снижая тем самым pH водного раствора. Слабые основания принимают протон, повышая pH. Тенденция принимать или отдавать протон для каждого конкретного основания или кислоты характеризуется константой диссоциации (K_a):

$$K_{eq} = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = K_a$$

- Значение pK_a отражает относительную силу слабого основания или кислоты в логарифмических единицах: $pK_a = \lg(1/K_a) = -\lg K_a$.
- Чем сильнее кислота, тем ниже pK_a этой кислоты; чем сильнее основание, тем выше pK_a этого основания. Значение pK_a можно определить экспериментально: оно равно значению pH в средней точке кривой титрования данной кислоты или основания.

2.3. Роль буферных систем в поддержании pH в биологических системах

Почти каждый биологический процесс зависит от pH; даже незначительные изменения pH могут вызвать сильные изменения скоростей процессов. Это справедливо не только для тех реакций, в которых напрямую участвует ион H^+ , но и для тех, в которых он, как может показаться, не принимает никакого участия. Ферменты, катализирующие многие реакции в клетке, и различные молекулы, на которые они так или иначе воздействуют, содержат ионизируемые группы и характеризуются определенным значением pK_a . Например, протонированные аминокислоты и карбоксильные группы в аминокислотах, а также фосфатные группы в нуклеотидах выступают в качестве слабых кислот; их состояние ионизации зависит от pH среды. (Если ионизируемая группа спрятана вглубь белка, а не экспонирована на его поверхности, окруженной водным раствором, соответствующее значение pK_a , т. е. кажущееся значение pK_a , может сильно отличаться от pK_a в воде.) Ранее мы уже отмечали, что ионные взаимодействия важны для стабилизации белковых молекул и позволяют ферментам узнавать и связывать свои субстраты.

В клетках живых организмов поддерживается постоянное значение pH, соответствующее оптимальному состоянию ионизации биомолекул (обычно около 7). Значение pH во внеклеточной жидкости у многоклеточных организмов также строго регулируется. Постоянство pH достигается в первую очередь с помощью биологических буферов — смесей слабых кислот и сопряженных оснований.

Буферы — это смеси слабых кислот и сопряженных оснований

Буферы представляют собой водные системы, способные препятствовать изменению рН при добавлении небольших количеств кислоты (H^+) или основания (OH^-). Буферная система состоит из слабой кислоты (донора протона) и сопряженного с ней основания (акцептора протона). Примером буферной системы может служить смесь равных количеств уксусной кислоты и ацетата, что соответствует средней точке кривой титрования, показанной на рис. 2-16. Обратите внимание, что кривая титрования уксусной кислоты имеет относительно горизонтальный участок, распространяющийся приблизительно на одну единицу рН в каждую сторону от средней точки, соответствующей рН 4,76. При увеличении концентрации ионов H^+ или OH^- в этой области происходит лишь слабое изменение рН, которое намного меньше, чем изменения, возникающие при добавлении такого же количества этих ионов за пределами данного участка. Этот относительно плоский участок кривой соответствует **буферной зоне** сопряженной кислотно-основной пары уксусная кислота/ацетат. В средней точке буферной зоны, где концентрация донора протона (уксусной кислоты) точно равна концентрации сопряженного основания (ацетата), буферная емкость системы максимальна. Это означает, что увеличение концентрации ионов H^+ или OH^- в этой области вызывает минимальные изменения рН. Значение рН в средней точке кривой титрования точно равно значению $\text{p}K_a$ титруемой кислоты. При добавлении небольших количеств ионов H^+ или OH^- в ацетатный буфер его рН несколько изменяется, но эти изменения несоизмеримо слабее тех, которые наблюдаются при добавлении тех же количеств ионов в чистую воду или в раствор соли сильного основания и сильной кислоты (например, NaCl), не обладающей буферной емкостью.

Буферная емкость является результатом равновесия двух обратимых реакций, протекающих в растворе, содержащем приблизительно равные концентрации донора протонов и сопряженного с ним акцептора. На **рис. 2-18** продемонстрирован механизм действия буферной системы. Если мы добавляем к буферному раствору ионы H^+ или OH^- , возникает небольшое изменение в соотношении относительных концентраций слабой

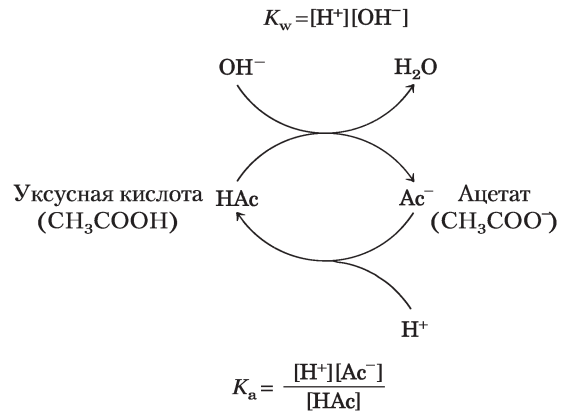


Рис. 2-18. Буферная система уксусная кислота/ацетат.

Благодаря обратимости реакции диссоциации уксусной кислоты система может принимать как ионы H^+ , так и OH^- . Донор протонов (уксусная кислота, HAc) имеет резерв связанных протонов, которые при необходимости могут выделяться и нейтрализовывать добавляемые в систему ионы OH^- с образованием H_2O . Это происходит, как только равновесие в системе нарушается и значение $[\text{H}^+][\text{OH}^-]$ превышает 10^{-14} M^2 (при 25°C). Равновесие быстро восстанавливается, так что ионное произведение воды вновь становится равным 10^{-14} M^2 , однако теперь временно концентрация H^+ оказывается снижена. В результате выражение $[\text{H}^+][\text{Ac}^-]/[\text{HAc}]$ ниже значения K_a , так что HAc вновь диссоциирует, пока система не достигнет равновесия. Аналогичным образом, сопряженное основание (Ac^-) может реагировать с добавляемыми в систему ионами H^+ . И вновь две реакции диссоциации стремятся к равновесию. В соответствии с данным механизмом сопряженная кислотно-основная пара, такая как уксусная кислота/ацетат, препятствует изменениям рН, вызванным добавлением небольших количеств кислоты или основания. Буферное действие — это всего лишь следствие взаимосвязи двух обратимых реакций, стремящихся к состоянию равновесия в соответствии с константами K_w и K_a .

кислоты и ее аниона и, следовательно, небольшое изменение рН. Уменьшение концентрации одного из компонентов буферной системы точно уравновешивается повышением концентрации другого компонента. Сумма компонентов при этом не меняется, меняется лишь их соотношение.

Для каждой сопряженной кислотно-основной пары характерна своя область рН, где она является эффективным буфером (рис. 2-17). Пара $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ имеет $\text{p}K_a = 6,86$ и поэтому проявляет свойства буфера в диапазоне рН от 5,9 до 7,9; пара $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ с $\text{p}K_a = 9,25$ может служить буфером в области рН от 8,3 до 10,3.

Уравнение Хендерсона–Хассельбаха. рН, рK_a и концентрации компонентов в буферной системе связаны простым соотношением

Кривые титрования уксусной кислоты, H₂PO₄⁻ и NH₄⁺ (рис. 2-17) мало различаются по форме. Это позволяет предположить, что все они отражают некую общую закономерность. И действительно так: форма кривой титрования любой кислоты описывается уравнением Хендерсона–Хассельбаха, анализ которого помогает понять буферные свойства и кислотно-основной баланс в крови и тканях позвоночных животных. Данное уравнение – по существу еще одна форма выражения константы диссоциации кислоты. Уравнение Хендерсона–Хассельбаха для диссоциации слабой кислоты HA с образованием ионов H⁺ и OH⁻ выглядит следующим образом:

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

Сначала решим это уравнение относительно [H⁺]:

$$[H^+] = K_a \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Возьмем отрицательный логарифм обеих частей уравнения:

$$-\lg[H^+] = -\lg K_a - \lg \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Заменяя $-\lg[H^+]$ на рН и $-\lg K_a$ на рK_a, получаем:

$$pH = pK_a - \lg \frac{[HA]}{[A^-]}$$

Теперь поменяем числитель и знаменатель в выражении $-\lg \frac{[HA]}{[A^-]}$, для чего потребуется изменить знак, и получим **уравнение Хендерсона–Хассельбаха**:

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (2-9)$$

Данное уравнение описывает кривые титрования всех слабых кислот и позволяет вывести ряд важных количественных соотношений. Например, из него следует, почему рK_a слабой кислоты численно равно значению рН в средней точке на кривой титрования. В данной точке [HA] = [A⁻], следовательно,

$$pH = pK_a + \lg 1 = pK_a + 0 = pK_a$$

Уравнение Хендерсона–Хассельбаха позволяет нам также: 1) рассчитать рK_a при заданном значении рН и молярном соотношении донора и акцептора протонов; 2) рассчитать рН, зная рK_a и молярное соотношение донора и акцептора протонов; 3) рассчитать молярное соотношение донора и акцептора протонов, если известны рН и рK_a.

Слабые кислоты и основания служат буферами в клетках и тканях

Внеклеточные и внутриклеточные жидкости многоклеточных организмов имеют характерные и практически постоянные значения рН. Первая линия защиты организма от изменений рН обеспечивается буферными системами. Цитоплазма большинства клеток содержит высокую концентрацию белков, состоящих из аминокислот, чьи функциональные группы действуют как слабые кислоты или основания. Например, рK_a имидазольного кольца в боковой цепи гистидина (рис. 2-19) составляет 6,0; таким образом, белки, содержащие остатки гистидина, являются эффективными буферами в области нейтральных значений рН, а боковая цепь гистидина в этой области значений рН может существовать как в протонированной, так и в непротонированной форме.

Пример 2-5

ДИССОЦИАЦИЯ ГИСТИДИНА

Рассчитайте, какова доля молекул гистидина, имеющих протонированное имидазольное кольцо при рН 7,3. Значения рK_a для гистидина: рK₁ = 1,82, рK₂ (имидазол) = 6,00 и рK₃ = 9,17 (см. рис. 3-12, б).

Решение. Три ионизируемые группы гистидина имеют достаточно сильно различающиеся значе-

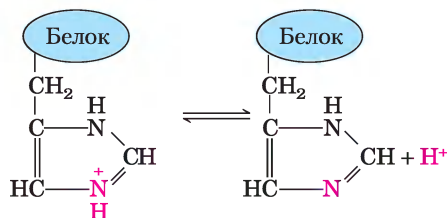


Рис. 2-19. Ионизация гистидина. Аминокислота гистидин, входящая в состав белков, представляет собой слабую кислоту. Значение рK_a протонированного азота в боковой цепи равно 6,0.

ния pK_a , так что первая кислота (группа $-\text{COOH}$) полностью ионизируется до того, как вторая группа (протонированный имидазол) начинает отдавать свой протон, а вторая группа в свою очередь полностью ионизируется до того, как начинает диссоциировать третья группа ($-\text{NH}_3^+$). (С помощью уравнения Хендерсона–Хассельбаха можно показать, что слабая кислота, ионизованная лишь на 1% при рН на две единицы ниже своего значения pK_a , ионизована на 99% при рН на две единицы выше значения pK_a ; см. также рис. 3-12, б.) При рН 7,3 карбоксильная группа гистидина полностью депротонирована ($-\text{COO}^-$), а α -аминогруппа полностью протонирована ($-\text{NH}_3^+$). Следовательно, можно утверждать, что при рН 7,3 частично диссоциирована лишь имидазольная группа, которая может находиться как в протонированной (обозначим ее через HisH^+), так и в депротонированной форме (His).

Используем уравнение Хендерсона–Хассельбаха:

$$\text{pH} = pK_a + \lg \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Подставляем значения $pK_2 = 6,0$ и $\text{pH} = 7,3$ и получаем:

$$7,3 = 6,0 + \lg \frac{[\text{His}]}{[\text{HisH}^+]}$$

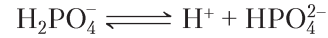
$$1,3 = \lg \frac{[\text{His}]}{[\text{HisH}^+]}$$

$$10^{1,3} = \frac{[\text{His}]}{[\text{HisH}^+]} = 2,0 \cdot 10^1$$

Таким образом, доля молекул гистидина, находящихся при рН 7,3 в протонированной форме HisH , составляет 1/21 (1 часть HisH^+ и 21 часть молекул гистидина, находящихся в любой форме), или около 4,8%.

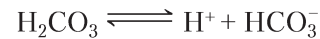
Нуклеотиды, такие как АТФ, как и многие другие низкомолекулярные метаболиты, содержат функциональные группы, способные к ионизации. Именно они обеспечивают буферные свойства цитоплазмы. Некоторые высокоспециализированные органеллы и внеклеточные компартменты содержат в больших концентрациях соединения, которые обеспечивают их буферную емкость: органические кислоты в вакуолях растений, аммонийный буфер в моче.

Фосфатная и бикарбонатная буферные системы играют наиболее важную роль с биологической точки зрения. В фосфатной буферной системе, действующей в цитоплазме любой клетки, в качестве донора протонов выступает H_2PO_4^- , а в качестве акцептора протонов — HPO_4^{2-} :



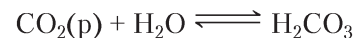
Фосфатный буфер наиболее эффективно действует в области рН, близкой к значению $pK_a = 6,86$ (рис. 2-15, 2-17), т. е. в диапазоне рН от 5,9 до 7,9. Таким образом, он эффективен как раз в биологических жидкостях. Например, в большинстве цитоплазматических компартментов клеток млекопитающих рН находится в интервале от 6,9 до 7,4 (см. пример 2-6).

Функции буфера в плазме крови частично выполняет бикарбонатная система, состоящая из угольной кислоты H_2CO_3 в качестве донора протона и бикарбоната HCO_3^- в качестве акцептора протона (K_1 — константа диссоциации по первой ступени):



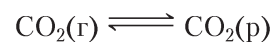
$$K_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

Данная буферная система сложнее других кислотно-основных пар, поскольку один из ее компонентов — угольная кислота — образуется при растворении (р) в воде диоксида углерода в соответствии с обратимой реакцией:



$$K_2 = \frac{[\text{CO}_2(\text{p})][\text{H}_2\text{O}]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

В нормальных условиях диоксид углерода — газ, и концентрация растворенного CO_2 определяется равновесием с газообразным CO_2 (г):



$$K_3 = \frac{[\text{CO}_2(\text{p})]}{[\text{CO}_2(\text{г})]}$$

Итак, рН бикарбонатного буфера определяется концентрацией H_2CO_3 и HCO_3^- , а концентрация H_2CO_3 , в свою очередь, определяется концентрацией растворенного CO_2 , которая зависит

Пример 2-6 ФОСФАТНЫЕ БУФЕРЫ

а) Рассчитайте pH смеси растворов 0,042 М NaH_2PO_4 и 0,058 М Na_2HPO_4 .

Решение. Применим уравнение Хендерсона–Хассельбаха

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \lg \frac{[\text{сопряженное основание}]}{[\text{кислота}]}$$

В нашем случае кислота (вещество, которое отдает протон) — H_2PO_4^- , а сопряженное основание (вещество, которое присоединяет протон) — HPO_4^{2-} . Подставив данные нам значения концентрации кислоты и сопряженного основания и $\text{p}K_a$ (6,86), получим:

$$\text{pH} = 6,86 + \lg \left(\frac{0,058}{0,042} \right) = 6,86 + \lg 1,38 = 6,86 + 0,14 = 7,0$$

Для грубой оценки правильности решения можно применить следующий принцип: если в растворе больше сопряженного основания, чем кислоты, то оттитровано более 50% кислоты, и, таким образом, pH больше $\text{p}K_a$ (6,86; значение, при котором оттитровано точно 50% кислоты).

б) Насколько изменится pH 1 л буфера, приготовленного в примере (а), если к нему добавить 1,0 мл 10,0 н. NaOH?

Решение. 1 л буфера содержит 0,042 моль NaH_2PO_4 . При добавлении 1,0 мл 10,0 н. NaOH (0,010 моль) эквивалентное количество (0,010 моль) NaH_2PO_4 переходит в Na_2HPO_4 , получается 0,032 моль NaH_2PO_4 и 0,068 моль Na_2HPO_4 . pH такого раствора равен:

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{p}K_a + \lg \frac{[\text{HPO}_4^{2-}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]} \\ &= 6,86 + \lg \frac{0,068}{0,032} = 6,86 + 0,33 = 7,2 \end{aligned}$$

в) Насколько изменится pH 1 л чистой воды (pH = 7), если к нему добавить 1,0 мл 10,0 н. NaOH? Сравните результат с полученным в предыдущем примере.

Решение. NaOH полностью диссоциирует на ионы Na^+ и OH^- : $[\text{OH}^-] = 0,010$ моль/л, или $1,0 \cdot 10^{-2}$ М. $\text{pOH} = -\log [\text{OH}^-]$, $\text{pOH} = 2,0$. Зная, что $\text{pOH} + \text{pH} = 14$ для всех растворов, получаем, что в нашем растворе pH = равен 12.

Как видим, одно и то же количество NaOH меняет pH 1 л воды с 7 до 12, а буфера из примера (б) всего лишь с 7 до 7,2, что показывает эффективность буферных растворов!

от концентрации CO_2 в газовой фазе или **парциального давления** CO_2 (обозначается $p\text{CO}_2$). В итоге pH бикарбонатного буфера, находящегося в контакте с газовой фазой, определяется концентрацией HCO_3^- в водной фазе и $p\text{CO}_2$ в газовой фазе.



Бикарбонатный буфер играет важную физиологическую роль, поскольку поддерживает pH плазмы крови около значения 7,4. В такой буферной системе, как было сказано выше, действуют три взаимосвязанных обратимых равновесия, в данном случае между газообразным CO_2

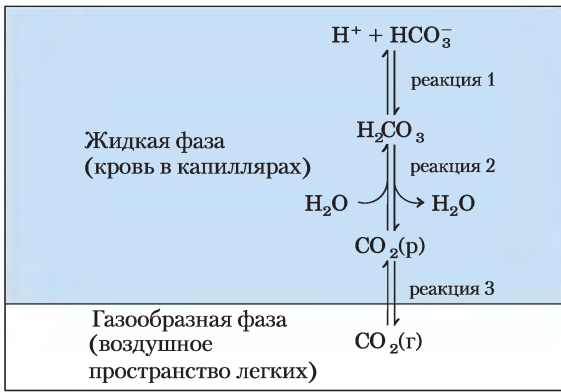


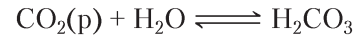
Рис. 2-20. Бикарбонатная буферная система. Между CO₂, находящимся в воздушном пространстве легких, и бикарбонатным буфером в плазме крови, протекающей через капилляры легких, существует равновесие. Поскольку концентрация растворенного CO₂ быстро регулируется интенсивностью дыхания, бикарбонатная буферная система крови находится практически в равновесии с обширным потенциальным резервуаром CO₂.

в воздушном пространстве легких и бикарбонатом (HCO₃⁻) в плазме крови (рис. 2-20).

Когда ионы H⁺ (например, из молочной кислоты, образующейся в мышечной ткани при большой физической нагрузке) попадают в кровь при ее прохождении через ткани, в реакции 1 на рис. 2-20 наступает новое равновесие, соответствующее более высокой концентрации H₂CO₃. При этом в соответствии с реакцией 2 возрастает концентрация CO₂(p) в крови, что по реакции 3 приводит к росту парциального давления CO₂(г) в воздушном пространстве легких, а лишний CO₂ выдыхается. Увеличение рН плазмы крови (например, в результате образования NH₃ при катаболизме белков) вызывает противоположный ход событий: снижение концентрации H⁺ в крови способствует усилению диссоциации H₂CO₃ на H⁺ и HCO₃⁻, что заставляет дополнительное количество газообразного CO₂ из легких растворяться в крови. Таким образом, интенсивность дыхания, т. е. скорость вдыхания воздуха и выдыхания CO₂, может обеспечить быстрые сдвиги равновесия, что способствует поддержанию в крови постоянного значения рН. Частота дыхания контролируется стволом головного мозга: при повышении содержания CO₂ в крови или снижении рН крови дыхание учащается и становится более глубоким.

При рН 7,4, соответствующем рН плазмы крови, в растворе присутствует в основном

HCO₃⁻ и совсем мало H₂CO₃, а при добавлении небольшого количества основания (NH₃ или OH⁻) происходит титрование H₂CO₃, приводящее к снижению буферной емкости. Кажется, что важная роль угольной кислоты (pK_a = 3,57 при 37 °С) в создании буферной системы плазмы крови (рН 7,4) противоречит выдвинутому нами ранее утверждению, что наиболее эффективный буфер создается в диапазоне pK_a ± 1 единица рН. Данный парадокс объясняется тем, что в крови содержится много растворенного углекислого газа CO₂(p), а его равновесие с H₂CO₃ устанавливается достаточно быстро:



Мы можем теперь определить константу K_h — константу равновесия реакции гидратации углекислого газа.

$$K_h = \frac{[\text{H}_2\text{CO}_3]}{[\text{CO}_2(\text{p})]}$$

Теперь, учитывая источник CO₂(p), можно записать [H₂CO₃] как K_h [CO₂(p)] и подставить это выражение в уравнение кислотной диссоциации H₂CO₃:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{K_h [\text{CO}_2(\text{p})]}$$

Теперь можно иначе записать равновесие в реакции диссоциации H₂CO₃:

$$K_h K_a = K_{\text{комбин.}} = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2(\text{p})]}$$

Можно рассчитать значение новой константы K_{комбин.} и кажущееся значение pK_{комбин.}, зная экспериментально определенные значения K_h (3,0 · 10⁻³ М) и K_a (2,7 · 10⁻⁴ М) при 37 °С:

$$K_{\text{комбин.}} = (3,0 \cdot 10^{-3} \text{ М}) (2,7 \cdot 10^{-4} \text{ М}) = 8,1 \cdot 10^{-7} \text{ М}^2$$

$$pK_{\text{комбин.}} = 6,1$$

В клинической практике часто значение кажущейся, или комбинированной, константы pK_{комбин.} принимают равным 6,1, что упрощает расчеты. В этом случае получаем:

$$\text{pH} = 6,1 + \lg \frac{[\text{HCO}_3^-]}{(0,23 \cdot p\text{CO}_2)}$$

где парциальное давление углекислого газа, pCO₂, выражено в килопаскалях (кПа; обычно

$p\text{CO}_2$ находится в диапазоне от 4,6 до 6,7 кПа), а 0,23 — это соответствующий коэффициент растворимости CO_2 в воде; в результате $0,23 \cdot p\text{CO}_2 \approx 1,2$ кПа. Концентрация HCO_3^- в плазме обычно составляет около 24 мМ. ■

При отсутствии лечения диабет приводит к угрожающему состоянию — ацидозу

Значение рН плазмы крови человека в норме колеблется от 7,35 до 7,45, так что многие ферменты плазмы крови проявляют максимальную активность именно в этом диапазоне рН. Нарушение механизма регуляции рН, например, при тяжелых формах диабета обусловлено «перепроизводством» метаболитических кислот, что вызывает падение рН крови до 6,8 и ниже (ацидоз) и может приводить к необратимым повреждениям клеток и к смерти. При некоторых других заболеваниях значение рН возрастает настолько, что тоже может стать причиной смерти.

Многие особенности структуры и функционирования клеток связаны со значением рН, а каталитическая активность ферментов особенно

чувствительна к этому параметру. Обычно ферменты проявляют максимальную каталитическую активность при определенном значении рН — **оптимуме рН** (рис. 2-21). Отклонение величины рН в любую сторону от оптимального значения часто сопровождается резким падением ферментативной активности. Таким образом, незначительные изменения рН могут приводить к большим изменениям скоростей некоторых важнейших ферментативных реакций. В связи с этим биологический контроль рН в клетке и в жидкостях организма играет необычайно важную роль во всех процессах метаболизма и клеточной активности, а изменение рН крови вызывает серьезные физиологические последствия (см. доп. 2-1).

Если больного диабетом не лечить, то недостаток инсулина или нечувствительность к инсулину (в зависимости от типа заболевания) приводит к нарушению процесса поступления глюкозы из крови в ткани и заставляет ткани использовать в качестве источника энергии запасенные жирные кислоты. По причинам, которые мы рассмотрим позднее (см. разд. 23.2), эта зависимость от жирных кислот вызывает накопление в высокой концентрации двух карбоновых кислот — β -гидроксимасляной и ацетоуксусной кислот (концентрация в плазме 90 мг в 100 мл по сравнению с < 3 мг в 100 мл у здорового человека; с мочой выводится около 5 г за 24 ч по сравнению с < 125 мг за 24 ч в норме). Диссоциация этих кислот снижает рН крови до значения ниже 7,35, что приводит к ацидозу. Тяжелый ацидоз сопровождается головными болями, сонливостью, тошнотой, рвотой и диареей, далее могут возникнуть ступор, кома и конвульсии; по-видимому, основной причиной таких последствий является неоптимальная работа некоторых ферментов. Если у пациента обнаружена высокая концентрация глюкозы в крови, низкое значение рН плазмы и высокий уровень содержания β -гидроксимасляной и ацетоуксусной кислот в крови и моче, наиболее вероятный диагноз в таком случае — сахарный диабет.

К ацидозу могут также приводить и другие состояния. Употребление постной пищи и голодание приводят к использованию в качестве источника энергии запасных жирных кислот и в результате — к тем же последствиям, что и диабет. Очень высокая физическая нагрузка, какую испытывают, например, спринтеры или велосипедисты, приводит к временному накоплению в крови молочной кис-

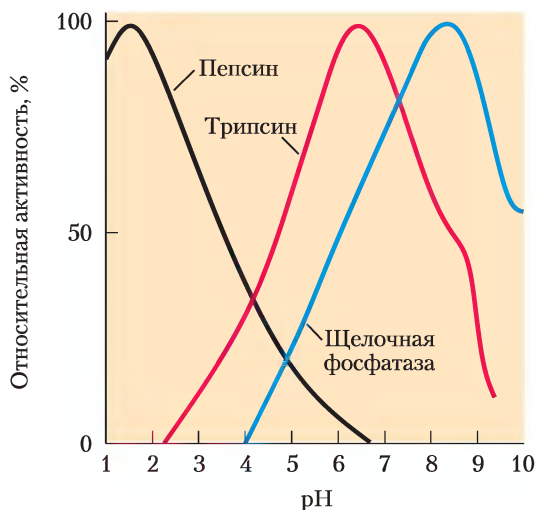


Рис. 2-21. Оптимальный уровень рН для некоторых ферментов. Пепсин — пищеварительный фермент, находящийся в желудочном соке, рН которого составляет около 1,5. Именно такие условия оптимальны для действия пепсина. Пищеварительный фермент трипсин действует в тонком кишечнике, поэтому его оптимум рН совпадает с нейтральным значением рН в просвете тонкой кишки. Щелочная фосфатаза костной ткани — гидролитический фермент, участвующий в минерализации костного вещества.



Ниже представлен фрагмент записей Дж. Б. С. Холдейна, относящихся к эксперименту по контролю уровня pH крови и опубликованных им в книге «Возможные миры» (Possible Worlds, Harper and Brothers, 1928).

«Я хотел понять, что произойдет с человеком, если его сделать более кислым или более щелочным... Кто-то скажет, что сначала следовало бы поставить эксперимент на кролике, и некоторые исследователи как раз и действуют в этом направлении, однако трудно понять, что на самом деле чувствует кролик в определенной ситуации. И действительно, некоторые кролики совершенно не готовы к сотрудничеству.

...Поэтому я и мой коллега начали ставить эксперименты друг на друге. Мой коллега доктор Х. В. Дэвис и я принялись подщелачивать свой организм, усиленно дыша и употребляя в пищу около трех унций бикарбоната натрия. Подкисляли мы себя путем сидения в душевой комнате с содержанием углекислого газа от шести до семи процентов. В результате мы дышали так, как будто только что закончили состязание по гребле, к тому же у нас была довольно сильная головная боль. Каждый из нас провел в комнате не более двух часов, хотя в нашей газовой камере не оставалось неискоренимого запаха горчичного газа от экспериментов военного времени, который заставлял всхлипывать каждого, кто входил в комнату. Наиболее очевидная вещь, которую следовало проделать, — выпить соляную кислоту. Если ее пить неразбавленной, она растворяет зубы и сжигает гортань, но я хотел позволить ей продиффундировать во все отделы организма. Самый крепкий раствор, который я пил, состоял из одной части концентрированной кислоты и ста частей воды. Но уже pinty для меня было достаточно, так как я получил раздражение пищевода и желудка, хотя расчеты показывали, что для достижения нужного мне эффекта мне следовало выпить полтора галлона... Я утверждал, что если глотать хлорид аммония, то в организме он частично разлагается, высвобождая соляную кислоту. Теперь это доказано... Печень превращает аммо-

ний в безопасное вещество мочевины, и лишь затем оно попадет в сердце и головной мозг. Соляная кислота соединяется с бикарбонатом натрия, который присутствует во всех тканях, в результате чего образуется хлорид натрия и углекислый газ. Таким образом, этот газ образовывался во мне со скоростью шесть квартал в час (хотя все же менее часа)...

Я был удовлетворен тем, что мне удалось воспроизвести в себе тот тип учащенного дыхания, который наблюдается на терминальной стадии болезней почек и диабета. Было давно известно, что это симптомы отравления кислотой, однако каждый случай отравления кислотой усложняется дополнительными химическими аномалиями, так что было непонятно, какие же симптомы вызваны действием кислоты как таковой».

«Теперь перенесемся в Гейдельберг, где Фройденберг и Гиорги изучали тетанию у детей... Им пришлось в голову, что было бы неплохо проверить, что будет, если организм больного станет более кислым. Тетания была случайно обнаружена у нескольких пациентов, которых лечили от других недугов большими дозами бикарбоната натрия или которые потеряли большое количество соляной кислоты в результате частой рвоты. Если щелочность тканей приводит к тетании, то, возможно, кислота могла бы излечить от нее. К сожалению, мало кто возьмется лечить умирающего ребенка, помещая его в комнату, наполненную углекислым газом, или давая ему выпить соляной кислоты. Так что из этой идеи ничего не вышло; врачи давали больным известь, которую трудно проглотить и которая нарушает пищеварение, но которая, безусловно, помогла во многих случаях заболевания тетанией.

Но когда они прочли мою статью о воздействии хлорида аммония, они стали давать его детям и были обрадованы тем, что тетания отступала уже через несколько часов. Потом этот способ использовался еще и в Англии, и в Америке, как для детей, так и для взрослых. Это лечение не устраняет причину заболевания, но приводит больного в такое состояние, в котором он имеет большой шанс выздороветь».

лоты. При почечной недостаточности нарушается способность организма регулировать уровень бикарбоната в крови. При заболеваниях легких (таких как эмфизема, пневмония и астма) снижается способность распределять CO_2 , образующийся при окислении энергетических веществ в тканях,

что приводит к накоплению H_2CO_3 . При ацидозе следует идентифицировать и лечить вызвавшее его заболевание: диабетикам назначают инсулин, пациентам с тяжелыми легкими — стероиды или антибиотики. В особо тяжелых случаях пациентам внутривенно вводят раствор бикарбоната. ■

Пример 2-7**ЛЕЧЕНИЕ АЦИДОЗА БИКАРБОНАТОМ**

Почему внутривенное введение раствора бикарбоната повышает рН плазмы крови?

Решение. Отношение $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2(\text{p})]$ определяет рН бикарбонатного буфера в соответствии с уравнением:

$$\text{pH} = 6,1 + \lg \frac{[\text{HCO}_3^-]}{(0,23 \cdot p\text{CO}_2)}$$

Если $[\text{HCO}_3^-]$ возрастает, а $p\text{CO}_2$ не меняется, то рН увеличивается.

Краткое содержание раздела 2.3**РОЛЬ БУФЕРНЫХ СИСТЕМ В ПОДДЕРЖАНИИ рН В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

- Смесь слабой кислоты (или основания) и ее соли препятствует изменениям рН, вызванным добавлением ионов H^+ или OH^- , т. е. действует в качестве буфера.
- Значение рН раствора слабой кислоты (или основания) и ее соли можно вычислить по уравнению Хендерсона–Хассельбаха:

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \lg \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

- Значение рН внутриклеточных и внеклеточных жидкостей организма поддерживается на оптимальном (физиологическом) уровне (обычно рН около 7,0) с помощью фосфатного и бикарбонатного буферов. Для большинства ферментов такие значения рН являются оптимальными.
- Состояния, при которых рН увеличивается, приводя к ацидозу, или снижается, приводя к алкалозу, могут угрожать жизни человека.

2.4. Участие воды в реакциях

Вода является не просто средой, в которой происходят химические реакции в живых клетках; она принимает непосредственное участие во многих

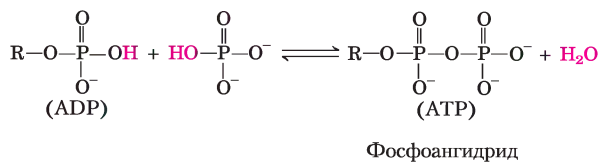
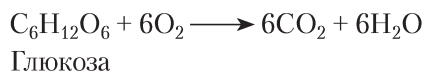


Рис. 2-22. Участие воды в биологических реакциях. АТФ представляет собой фосфоангидрид, образующийся в реакции конденсации (потери молекулы воды) между ADP и фосфатом. Под R на данном рисунке подразумевается аденозинмонофосфат. Эта реакция конденсации идет с затратой энергии. Обратная реакция — гидролиз (присоединение молекулы воды) АТФ до ADP и фосфата — идет с выделением эквивалентного количества теплоты. Эти реакции конденсации и гидролиза АТФ — только один пример роли воды как реагента в биологических процессах.

химических реакциях. Образование АТФ из ADP и неорганического фосфата — это пример **реакции конденсации**, идущей с образованием воды (**рис. 2-22**). Обратная реакция (гидролиз) идет с присоединением молекулы воды. Реакции гидролиза происходят при ферментативном разложении белков, углеводов и нуклеиновых кислот. **Реакции гидролиза**, протекающие под действием ферментов **гидролаз**, практически всегда являются экзергоническими — при образовании двух молекул из одной возрастает энтропия системы. А обратные реакции, т. е. образование клеточных полимеров из мономерных звеньев (конденсация), являются эндергоническими и не могут протекать самопроизвольно. Как увидим далее, клетка умеет обходить эти термодинамические запреты, сопрягая эндергонические реакции конденсации с такими экзергоническими процессами, как, например, разрыв ангидридной связи в молекуле АТФ.

Когда вы читаете эту книгу, вы поглощаете кислород (по крайней мере, мы на это надеемся!). В результате окисления топливных молекул (например, глюкозы) образуются вода и углекислый газ. Суммарная реакция выглядит следующим образом:



Некоторым животным, обитающим в условиях очень сухого климата (песчанкам, кенгуровым крысам, верблюдам), этой «метаболической» воды, образующейся при окислении пищи и за-

пасных жиров, хватает для того, чтобы длительное время обходиться без питьевой воды.

В эритроцитах углекислый газ, образующийся при окислении глюкозы по реакции, катализируемой ферментом карбоангидразой, превращается в растворимый HCO_3^- :



В данной реакции вода не только выступает в качестве субстрата, но также участвует в переносе протона, образуя цепочки связанных водородными связями молекул, через которые осуществляются «прыжки» протонов (рис. 2-13).

Зеленые растения и водоросли для расщепления воды в процессе фотосинтеза используют энергию солнечного света:



Здесь под А подразумеваются электроноакцепторные молекулы, которые могут быть разными у разных типов фотосинтезирующих организмов. Вода в этой реакции служит донором электронов в окислительно-восстановительной цепи (рис. 19-57), играющей ключевую роль в любом живом организме.

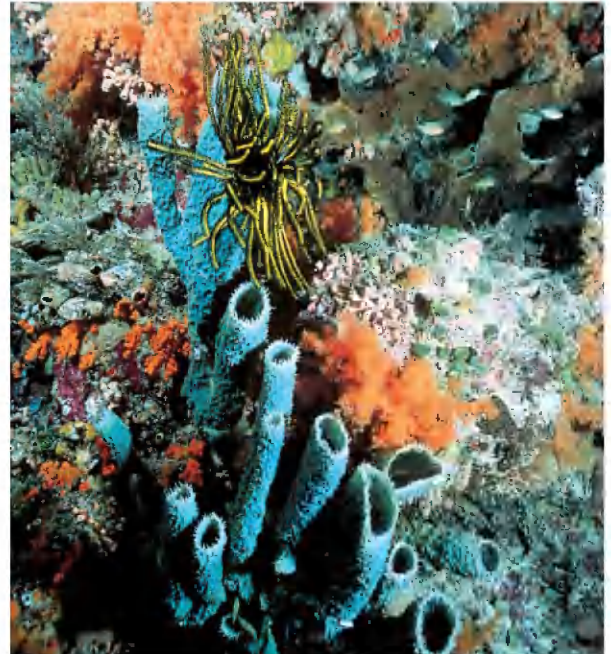
Краткое содержание раздела 2.4 УЧАСТИЕ ВОДЫ В РЕАКЦИЯХ

- Вода в биологических системах выполняет двойную функцию: является средой, в которой происходят реакции метаболизма, и сама участвует во многих биологических процессах, таких как гидролиз, конденсация и окислительно-восстановительные реакции.

2.5. Живые организмы приспособлены к водной среде

Живые организмы успешно приспособились к водной среде и используют ее необычные свойства. Благодаря своей высокой удельной теплоемкости (количество тепловой энергии, необходимое для повышения температуры 1 г вещества на 1°C) вода действует в клетках как «тепловой буфер», позволяющий поддерживать в организме относительно постоянную температуру вне зависимости

от изменений температуры окружающей среды и от количества тепла, выделяющегося в процессе метаболизма. Кроме того, высокая теплота испарения воды (табл. 2-1) используется некоторыми позвоночными для защиты организма от перегрева путем испарения пота. Сильно выраженное сцепление молекул в жидкой воде, обусловленное действием межмолекулярных водородных связей, способствует эффективному транспорту растворенных питательных веществ от корней к листьям растений в процессе транспирации. Даже то, что лед имеет более низкую плотность, чем вода, важно для жизненного цикла водных организмов. Замерзание водоемов начинается с поверхности, и образующийся слой льда защищает нижний слой воды и его обитателей от холодного атмосферного воздуха и от замерзания. Однако наиболее существенным для всех живых организмов является тот факт, что многие физические и биологические свойства макромолекул, в частности белков и нуклеиновых кислот, обусловлены их взаимодействием с молекулами воды. Вода оказала глубокое и решающее влияние на ход биологической эволюции. Если где-то еще во Вселенной существует жизнь, она вряд ли напоминает земную, разве что это место так же богато жидкой водой, как Земля.



В воде обитают многочисленные виды живых организмов. Мягкие кораллы, губки, мшанки и водоросли конкурируют за пространство на этом рифе у Филиппинских островов.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

рН 92	Ионное произведение
рK_a 94	воды (K_w) 91
Алкалоз 93	Конденсация 104
Амфифильный 81	Константа диссоциации
Ацидоз 93	кислоты (K_a) 94
Буфер 97	Константа равновесия
Буферная зона 97	(K_{eq}) 90
Ван-дер-ваальсовы	Кривая титрования 94
взаимодействия 82	Мицелла 81
Водородная связь 75	Осмолярность 85
Гидролиз 104	Осмоз 85
Гидрофильный 77	Силы Лондона 82
Гидрофобный 77	Сопряженная кислотно-
Гидрофобные взаимодей-	основная пара 94
ствия 81	Уравнение Хендерсона–
Гипертонический 86	Хассельбаха 98
Гипотонический 86	Энергия диссоциации
Изотонический 85	75

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая информация

Belton, P.S. (2000) Nuclear magnetic resonance studies of the hydration of proteins and DNA. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 993–998.

Denny, M.W. (1993) *Air and Water: The Biology and Physics of Life's Media*, Princeton University Press, Princeton, NJ.

Замечательный обзор, посвященный свойствам воды с биологической точки зрения.

Eisenberg, D. & Kauzmann, W. (1969) *The Structure and Properties of Water*, Oxford University Press, New York.

Классическая работа, посвященная физической химии воды и гидрофобным взаимодействиям.

Franks, F. & Mathias, S.F. (eds) (1982) *Biophysics of Water*, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Большой набор статей по структуре чистой воды и цитоплазмы.

Gerstein, M. & Levitt, M. (1998) Simulating water and the molecules of life. *Sci. Am.* **279** (November), 100–105.

Хорошо иллюстрированное описание метода компьютерного моделирования для изучения важных комплексов воды с белками и нуклеиновыми кислотами.

Kandori, H. (2000) Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 177–191.

Обзор средней степени сложности о роли внутренних цепочек воды для переноса протона в бактериородопсине.

Kornblatt, J. & Kornblatt, J. (1997) The role of water in recognition and catalysis of enzymes. *The Biochemist* **19** (3), 14–17.

Краткий полезный обзор о влиянии связанной воды на структуру и функции белков.

Kuntz, I.D. & Zipp, A. (1977) Water in biological systems. *N. Engl. J. Med.* **297**, 262–266.

Краткий обзор физических состояний воды в цитозоле и ее взаимодействий с растворенными биомолекулами.

Luecke, H. (2000) Atomic resolution structures of bacteriorhodopsin photocycle intermediates: the role of discrete water molecules in the function of this light-driven ion pump. *Biochim. Biophys. Acta* **1460**, 133–156.

Углубленный обзор, посвященный протонным насосам, использующим внутренние цепи молекул воды.

Nicolls, P. (2000) Introduction: the biology of the water molecule. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 987–992.

Краткий обзор свойств воды, предваряющий серию прекрасных обзорных статей, опубликованных в том же номере (особенно Pocker, а также Rand et. al., см. ниже).

Symons, M.C. (2000) Spectroscopy of aqueous solutions: protein and DNA interactions with water. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 999–1007.

Westhof, E. (ed.) (1993) *Water and Biological Macromolecules*, CRC Press, Inc., Boca Ration, FL.

Книга из 14 глав, каждая из которых написана отдельным автором, на углубленном уровне отражает исследования структуры воды и ее взаимодействий с белками, нуклеиновыми кислотами, полисахаридами и липидами.

Wiggins, P.M. (1990) Role of water in some biological processes. *Microbiol. Rev.* **54**, 432–449.

О роли воды в биологии с обсуждением физической структуры жидкой воды, ее взаимодействий с биомолекулами, а также состояния воды в живых клетках.

Осмоз

Cayley, D.S., Guttman, H.J., & Record, M.T., Jr. (2000) Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. *Biophys. J.* **78**, 1748–1764.

Углубленное физическое исследование водной фракции цитоплазмы бактерии *Escherichia coli*, выращенной на средах с разной осмолярностью (см. также Record et al., 1998, представлена ниже).

Rand, R.P., Parsegian, V.A., & Rau, D.C. (2000) Intracellular osmotic action. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1018–1032.

Обзор роли воды в ферментативном катализе; результаты получены при изучении концентрированных растворов.

Record, M.T., Jr., Courtenay, E.S., Cayley, D.S., & Guttman, H.J. (1998) Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 143–148.

Обзор среднего уровня сложности о способах, которыми бактериальные клетки регистрируют изменения осмотической окружающей среды (см. также Cayley et al., 2000, представлена выше).

Zonia, L., & Munnik, T. (2007) Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function. *Trends Plant Sci.* **12**, 90–97.

Слабые взаимодействия в водных средах

Chaplin, M. (2006) Do we underestimate the importance of water in cell biology? *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* **7**, 861–866.

Fersht, A.R. (1987) The hydrogen bond in molecular recognition. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 301–304.

Четкое и краткое количественное описание роли водородных связей в узнавании на молекулярном уровне и ферментативном катализе.

Frieden, E. (1975) Non-covalent interactions: key to biological flexibility and specificity. *J. Chem. Educ.* **52**, 754–761.

Обзор и примеры четырех типов слабых взаимодействий, стабилизирующих макромолекулы и определяющих их биологическую специфичность.

Jeffrey, G.A. (1997) *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press, New York.

Детальное обсуждение структуры и свойств водородных связей, в том числе в воде и биомолекулах.

Ladbury, J. (1996) Just add water! The effect of water on the specificity of protein-ligand binding sites and its potential application to drug design. *Chem. Biol.* **3**, 973–980.

Levy, Y. & Onuchic, J.N. (2006) Water mediation in protein folding and molecular recognition. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**, 389–415.

Углубленное обсуждение роли воды в структуре белка.

Martin, T.W. & Derewenda, Z.S. (1999) The name is bond – H-bond. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 403–406.

Обзор доказательств, подтверждающих, что водородные связи частично носят ковалентный характер.

Pocker, Y. (2000) Water in enzyme reactions: biophysical aspects of hydration-dehydration processes. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 1008–1017.

Обзор роли воды в ферментативном катализе на примере карбоангидразы.

Schwabe, J.W.R. (1997) The role of water in protein-DNA interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 126–134.

Обсуждение значения воды для специфичности и сроства во взаимодействиях между белками и ДНК.

Stillinger, F.H. (1980) Water revisited. *Science* **209**, 451–457.

Короткий обзор физической структуры воды, включающий обсуждение важной роли водородных связей и природы гидрофобных взаимодействий.

Tanford, C. (1978) The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science* **200**, 1012–1018.

Обзор химических и энергетических основ гидрофобных взаимодействий между биомолекулами в водных растворах.

Слабые кислоты, слабые основания и буферы: практические задачи

Segel, I.H. (1976) *Biochemical Calculations*, 2nd edn, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Вопросы и задачи

1. Растворимость этанола в воде. Объясните, почему этанол $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ лучше растворяется в воде, чем этан CH_3CH_3 .

2. Расчет значения pH по концентрации ионов водорода. Каков pH раствора с концентрацией протонов а) $1,75 \cdot 10^{-5}$ моль/л; б) $6,50 \cdot 10^{-10}$ моль/л; в) $1,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л; г) $1,50 \cdot 10^{-5}$ моль/л?

3. Расчет концентрации ионов водорода по значению pH. Какова концентрация протонов в растворе с pH а) 3,82; б) 6,52; в) 11,11?

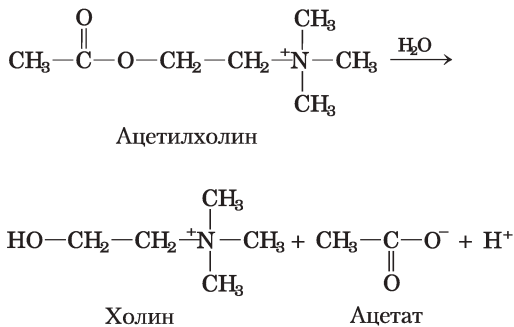


4. Кислотность соляной кислоты в желудке. В клинической лаборатории проводили титрование 10 мл желудочного сока, взятого у пациента через несколько часов после еды, с помощью 0,1 М раствора NaOH до нейтральной реакции. Для этого понадобилось 7,2 мл NaOH. В желудке пациента к этому времени уже не содержалось непереваренной пищи или напитков, так что считаем, что никаких буферов в желудочном соке нет. Какова была кислотность желудочного сока?

5. Расчет pH раствора сильной кислоты или сильного основания. а) Напишите реакцию диссоциации соляной кислоты. б) Рассчитайте pH раствора $5,0 \cdot 10^{-4}$ М HCl. в) Напишите реакцию диссоциации гидроксида натрия. г) Рассчитайте pH раствора $7,0 \cdot 10^{-5}$ М NaOH.

6. Расчет значения pH на основании концентрации сильной кислоты. Найдите pH раствора, приготовленного разведением 3,0 мл 2,5 М HCl водой до конечного объема 100 мл.

7. Определение содержания ацетилхолина по изменению рН. Концентрацию медиатора ацетилхолина можно определить по изменению рН в процессе гидролиза этого вещества. При инкубации ацетилхолина с ферментом ацетилхолинэстеразой он количественно превращается в холин и уксусную кислоту, которая диссоциирует с образованием ацетат-иона и иона водорода:



По данным анализа, водный раствор, содержащий неизвестное количество ацетилхолина, имел объем 15 мл и рН 7,65. После инкубации с ацетилхолинэстеразой рН раствора снизился до 6,87. Сколько молей ацетилхолина содержалось в 15 мл образца? Считайте, что анализируемая смесь не содержала буферов.

8. Физический смысл константы рK_a. Какой из перечисленных ниже водных растворов имеет самое низкое значение рН: 0,1 М НСl; 0,1 М уксусная кислота (рK_a = 4,86); 0,1 М муравьиная кислота (рK_a = 3,75)?

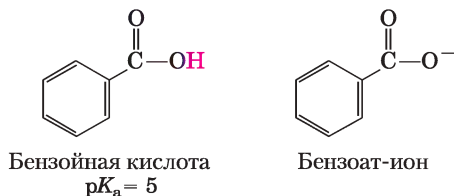
9. Приготовление уксуса. Один из способов приготовления уксуса (далеко не самый лучший) состоит в разведении уксусной кислоты, единственного кислого компонента уксуса, до подходящего значения рН (см. рис. 2-14) и добавлении необходимых вкусовых добавок. При 25 °С уксусная кислота (M_r = 60) представляет собой жидкость с плотностью 1,049 г/мл. Рассчитайте объем уксусной кислоты, который нужно добавить к дистиллированной воде, чтобы получить 1 л уксуса (см. рис. 2-15).

10. Идентификация сопряженного основания. Какое вещество в приведенных парах сопряженное основание?

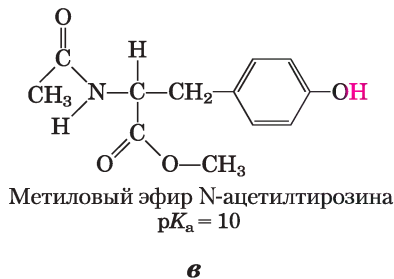
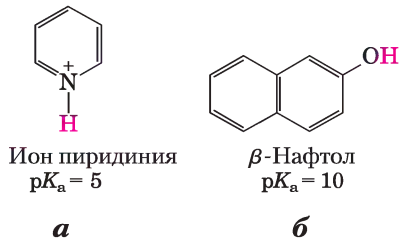
- а) RCOOH, RCOO⁻ в) H₂PO₄⁻, H₃PO₄
 б) RNH₂, RNH₃⁺ г) H₂CO₃, HCO₃⁻

11. Расчет рН раствора слабой кислоты и сопряженного основания. Найдите рН разбавленного раствора, содержащего следующие молярные отношения ацетата калия и уксусной кислоты (рK_a = 4,76): а) 2:1; б) 1:3; в) 5:1; г) 1:1; д) 1:10.

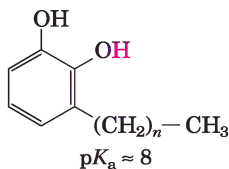
12. Зависимость растворимости от рН. Сильно выраженная полярность воды и способность легко образовывать водородные связи делают ее прекрасным растворителем для находящихся в ионной форме (заряженных) веществ. Напротив, неионизированные и неполярные органические вещества, такие как бензол, очень плохо растворяются в воде. В принципе растворимость в воде любой органической кислоты или основания можно увеличить, переведя молекулу в заряженную форму. Например, бензойная кислота плохо растворяется в воде, однако добавление к раствору бикарбоната натрия приводит к повышению рН и депротонированию молекул бензойной кислоты с образованием бензоат-ионов, которые хорошо растворимы.



Рассмотрите приведенные ниже формулы веществ: в каком растворе они лучше растворятся — в 0,1 М NaOH или в 0,1 М НСl? Красным цветом отмечены протоны, способные диссоциировать.



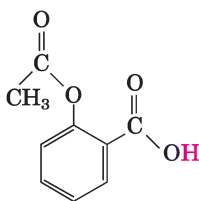
13. Лечение сыпи, вызванной контактом с ядовитым плющом. Производные катехола с длинными цепями алкильных групп, содержащиеся в ядовитом плюще и ядовитом дубе, вызывают характерную зудящую сыпь.



Если вы случайно дотронулись до ядовитого плюща, то какой из предложенных ниже способов обработки пораженного участка кожи следует применить и почему?

- Промывание поверхности кожи холодной водой.
- Промывание поверхности кожи разбавленным уксусом или лимонным соком.
- Промывание поверхности кожи водой с мылом.
- Промывание поверхности кожи водой с мылом и с бикарбонатом натрия (питьевой содой).

14. Значение pH и всасывание лекарственных веществ. Аспирин представляет собой слабую кислоту с pK_a 3,5.



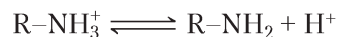
Он всасывается в кровь через клетки слизистой желудка и тонкой кишки. Для всасывания вещества необходимо, чтобы оно проникало сквозь плазматическую мембрану. Скорость этого процесса определяется полярностью молекулы: заряженные и сильнополярные вещества проникают медленно, а нейтральные гидрофобные молекулы проходят сквозь мембрану легко. Значение pH в содержимом желудка примерно равно 1,5, а в тонкой кишке — около 6. Откуда (из желудка или из кишечника) большее количество аспирина проникает в кровь и почему?

15. Расчет pH по молярной концентрации компонентов раствора. Каково значение pH раство-

ра, содержащего 0,12 моль/л NH_4Cl и 0,03 моль/л NaOH (для пары $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ $pK_a = 9,25$)?

16. Расчет pH раствора после титрования слабой кислоты. Вещество имеет pK_a 7,4. К 100 мл 1,0 М раствора этого вещества с pH 8,0 добавили 30 мл 1,0 М соляной кислоты. Каков pH полученного раствора?

17. Свойства буфера. Аминокислота глицин часто используется в биохимической практике в качестве основного компонента буфера. Аминогруппа глицина, имеющая pK_a 9,6, может существовать либо в протонированной форме ($-\text{NH}_3^+$), либо в виде свободного основания ($-\text{NH}_2$) в соответствии с равновесием:



а) В каком интервале pH глицин может быть использован в качестве эффективного буфера?

б) Какова доля молекул глицина с протонированной аминогруппой ($-\text{NH}_3^+$) в 0,1 М растворе при pH 9,0?

в) Какой объем 5 М раствора KOH нужно добавить к 1 л 0,1 М раствора глицина с pH 9,0, чтобы значение pH стало равно 10,0?

г) Каким должно быть численное соотношение между pH раствора и pK_a аминогруппы глицина, чтобы 99% молекул глицина находились в протонированной форме?

18. Приготовление фосфатного буфера. Каково отношение молярных концентраций HPO_4^{2-} и H_2PO_4^- в растворе с pH 7,0? Фосфорная кислота (H_3PO_4) имеет три значения pK_a : 2,14, 6,86 и 12,4. *Подсказка.* Достаточно знать лишь одну константу pK_a .

19. Приготовление стандартного буфера для калировки pH-метра. Стекланный электрод pH-метра дает электрический сигнал, величина которого пропорциональна концентрации ионов водорода. Для того чтобы по величине сигнала можно было определить значение pH, необходимо калировать стекланный электрод с помощью стандартных растворов с известной концентрацией ионов H^+ . Определите, какие количества в граммах однозамещенного фосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, M_r 138) и двузамещенного фосфата натрия (Na_2HPO_4 , M_r 141) необходи-

мо взять для приготовления 1 л стандартного буфера с рН 7,00, в котором суммарная концентрация фосфатов равна 0,100 М (см. рис. 2-15). Значения pK_a фосфорной кислоты возьмите из задачи 18.

20. Расчет отношения молярных концентраций сопряженного основания и слабой кислоты на основании значения рН. Каково отношение молярных концентраций сопряженного основания и слабой кислоты ($pK_a = 6,0$) при рН 5,0?

21. Приготовление буферного раствора с заданными значениями рН и ионной силы. Из 0,10 М растворов уксусной кислоты ($pK_a = 4,76$) и ацетата натрия приготовьте 1,0 л 0,10 М ацетатного буфера с рН 4,0. Объясните свои действия.

22. Выбор слабой кислоты для приготовления буфера. Раствор какого из перечисленных соединений имеет лучшие буферные свойства при рН 5,0: муравьиная кислота ($pK_a = 3,8$), уксусная кислота ($pK_a = 4,76$) или этиламин ($pK_a = 9,0$)? Кратко поясните свой ответ.

23. Работа с буферными растворами. Буферный раствор содержит 0,010 моль/л молочной кислоты ($pK_a = 3,86$) и 0,050 моль/л лактата натрия. а) Определите рН буфера. б) Определите изменение рН, вызванное добавлением 5 мл 0,5 М HCl к 1 л буферного раствора. в) Как изменится рН, если такое же количество HCl добавить к 1 л воды?

24. Использование молярных концентраций при расчете рН. Каково значение рН раствора, содержащего 0,2 М ацетат натрия и 0,6 М уксусную кислоту ($pK_a = 4,76$)?

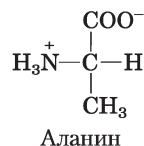
25. Приготовление ацетатного буфера. Определите концентрации уксусной кислоты ($pK_a = 4,76$) и ацетата натрия, необходимые для приготовления 0,2 М буферного раствора с рН 5,0.

26. рН защитного секрета насекомых. Вам повезло наблюдать насекомое, защищавшееся от врагов с помощью выделения едкого вещества. Анализ этой жидкости показывает, что суммарная концентрация в ней формиата и муравьиной кислоты ($K_a = 1,8 \cdot 10^{-4}$) составляет

1,45 М; концентрация формиат-иона составляет 0,015 М. Каков рН этого раствора?

27. Расчет pK_a . Возможно, что неизвестное вещество X имеет карбоксильную группу с $pK_a = 2,0$ и другую ионизируемую группу с pK_a в диапазоне от 5 до 8. Когда к 100 мл 0,1 М раствора вещества X с рН 2,0 прибавили 75 мл 0,1 М NaOH, и значение рН выросло до 6,72. Определите pK_a второй ионизируемой группы соединения X.

28. Ионные формы аланина. Аланин — двухосновная кислота, способная диссоциировать по двум ступеням (см. pK_a в табл. 3-1). а) Пользуясь приведенной ниже структурной формулой частично протонированной формы аланина (цвиттер-ион, см. рис. 3-9), изобразите структурные формулы двух других форм аланина, преобладающих в водном растворе: полностью протонированную и полностью депротонированную формы.



Какая из трех форм присутствует в наибольшей концентрации в растворах со следующими значениями рН: б) 1,0; в) 6,2; г) 8,02; д) 11,9? Объясните свой ответ, используя два значения pK_a .

29. Регуляция рН крови путем изменения интенсивности дыхания.

а) Парциальное давление CO_2 в легких может быстро меняться в зависимости от интенсивности и глубины дыхания. Например, известным средством избавления от икоты является повышение концентрации углекислого газа в легких. Этого можно добиться, если частично задерживать дыхание, медленно и неглубоко вдыхая воздух (гиповентиляция), или вдыхать и выдыхать воздух через бумажный пакет. В этих условиях парциальное давление CO_2 в воздушном пространстве легких превысит норму. Объясните, как эти процедуры влияют на рН крови.

б) Бегуны на короткие дистанции непосредственно перед стартом, скажем на стометровку, примерно полминуты интенсивно и глубоко дышат (гипервентиляция). Значение рН крови при этом может подняться вплоть до 7,6. Объясните, почему повышается значение рН крови.

в) При беге на короткую дистанцию в мышцах из запасов глюкозы образуется большое количество молочной кислоты ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, $K_a = 1,38 \cdot 10^{-4}$). Исходя из этого факта, объясните, почему перед стремительным бегом полезна гипервентиляция легких.

30. Расчет pH крови по концентрации CO_2 и бикарбоната. Найдите значение pH образца плазмы крови, в котором общая концентрация CO_2 составляет 26,9 мМ, а концентрация бикарбоната 25,6 мМ. Вспомните (с. 101), что нужная вам константа pK_a угольной кислоты равна 6,1.

31. Влияние задержки дыхания на значение pH крови. Значение pH внеклеточных жидкостей организма поддерживается буферной системой бикарбонат/угольная кислота. При задержке дыхания концентрация углекислого газа $\text{CO}_2(\text{г})$ в крови возрастает. Какое влияние это может оказать на pH внеклеточной жидкости? Объясните свой ответ с помощью соответствующих уравнений для данной буферной системы.

Анализ экспериментальных данных

32. «Переключаемые» поверхностно-активные вещества. Гидрофобные вещества плохо растворяются в воде, а вода очень часто используется в качестве растворителя. Это затрудняет многие процессы, такие как мытье жирной посуды, очистка поверхностей от пролитого жира, хранение салатных соусов, состоящих из водной и масляной фракций, а также проведение химических реакций с одновременным участием гидрофильных и гидрофобных компонентов.

Поверхностно-активные вещества (ПАВ, детергенты или сурфактанты) — это класс амфифильных соединений, к которым относятся мыла, детергенты и эмульгаторы. С помощью ПАВ гидрофобные вещества можно перевести в раствор в виде мицелл (рис. 2-7). Мицелла имеет гидрофобное ядро, в которое включены гидрофобные вещества и гидрофобные «хвосты» ПАВ. Гидрофильные «головки» ПАВ покрывают внешнюю поверхность мицеллы. Суспензию мицелл называют эмульсией. Чем более выраженными гидрофильными свойствами обладает «головка» ПАВ,

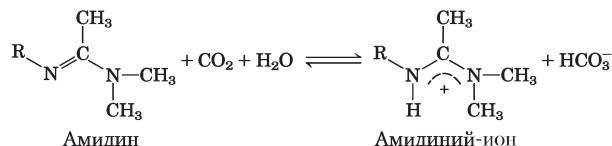
тем ПАВ мощнее, т. е. тем сильнее его способность переводить в эмульсию гидрофобное вещество.

Когда вы используете мыло для мытья жирной посуды, образуется эмульсия с жиром, которая легче удаляется водой, взаимодействующей с гидрофильными «головками» молекул мыла. Аналогичным образом, детергент можно использовать для перевода в эмульсию разлитого жира и облегчения его удаления водой. А эмульгаторы в готовых салатных соусах позволяют равномерно распределять частички масла в водной основе соуса.

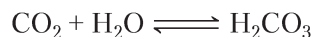
В некоторых ситуациях особенно удобно пользоваться «переключаемыми» ПАВ, т. е. веществами, которые могут находиться как в форме ПАВ, так и не ПАВ.

а) Представьте себе, что такой «переключаемый» ПАВ существует. Как бы вы использовали его для удаления жирного пятна и дальнейшего извлечения этого жира?

Лиу с соавторами описали прототип «переключаемого» ПАВ в своей статье «Переключаемые сурфактанты» (2006). Переключение основано на следующей реакции:



б) Учитывая, что pK_a типичного иона амидиния составляет 12,4, в какую сторону (налево или направо), по вашему мнению, сдвинуто равновесие приведенной выше реакции? (Необходимые значения pK_a представлены на рис. 2-16.) Поясните свой ответ. *Подсказка.* Вспомните реакцию:

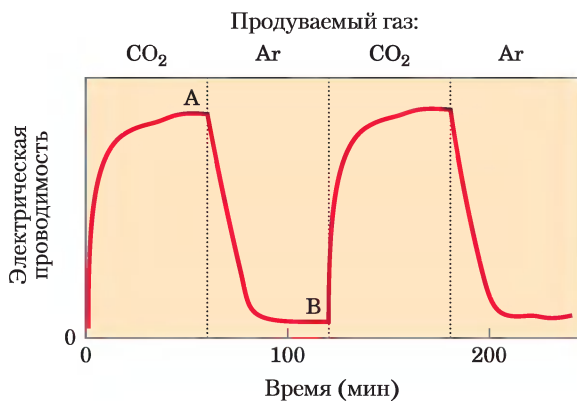


Лиу и соавт. создали переключаемое ПАВ, в котором $\text{R} = \text{C}_{16}\text{H}_{33}$

в) Амидиний-ион — мощный переключаемый ПАВ, амидин нет. Объясните это наблюдение.

Лиу с соавторами обнаружили, что вызвать переключение между двумя формами ПАВ можно путем изменения состава газа, продуваемого через раствор этого ПАВ. Они продемонстрировали это переключение, измеряя электропроводность раствора. Водные растворы ионных веществ обладают более высокой проводимостью, чем растворы неионных веществ. Эксперимент начался с раствора амидиновой формы ПАВ

в воде. Полученные результаты представлены ниже; пунктирные линии соответствуют переходу от одного газа к другому.



г) В какой форме находится большая часть ПАВ в точке А? В точке В?

д) Почему электропроводность возрастает от нулевой точки к точке А?

е) Почему при перемещении от точки А к точке В электропроводность падает?

ж) Объясните, как бы вы использовали такой ПАВ для удаления жирного пятна и извлечения жира.

Литература

Liu, Y., Jessop, P.G., Cunningham, M., Eckert, C.A., & Liotta, C.L. (2006) *Science* 313, 958–960.

Слово белок (протеин), которое я вам предлагаю... это производное от *proteios*, поскольку, по всей видимости, речь идет о первичном или исходном элементе в питании животных, которое создается растениями для травоядных, а затем становится пищей плотоядных.

Й. Я. Берцелиус. Из письма Ш. Мулдеру, 1838

3

Аминокислоты, пептиды и белки

3.1. Аминокислоты 114

3.2. Пептиды и белки 127

3.3. Как работать с белками 132

3.4. Структура белка: первичная структура 141

Белки участвуют практически в любом процессе, происходящем в клетке, демонстрируя неисчерпаемое разнообразие функций. При исследовании молекулярных механизмов биологических процессов биохимику неизбежно приходится изучать один или несколько белков. В количественном отношении белки занимают первое место среди биологических молекул. Они содержатся во всех клетках и в любой части клетки. Велико также разнообразие белков; в одной клетке можно обнаружить тысячи видов этих молекул. Кроме того, белки сильно различаются по биологическим функциям и представляют собой наиболее важные конечные продукты информационных метаболических путей, обсуждаемых в третьей части данной книги. Белки служат молекулярными инструментами, с помощью которых генетическая информация находит свое реальное воплощение.

Ключ к пониманию структуры тысяч различных белков кроется в строении относительно простых мономерных звеньев. Для построения всех белков, будь то белки самых древних линий

бактерий или современных биологических видов, используется один и тот же набор из 20 аминокислот, ковалентно связанных друг с другом в определенной линейной последовательности. Каждая аминокислота благодаря специфическим свойствам своей боковой цепи наделена химической индивидуальностью, поэтому эти 20 аминокислот можно рассматривать как алфавит «языка» белковой структуры. Белки бывают самого разного размера — от сравнительно небольших пептидов, построенных всего из нескольких аминокислотных остатков, до гигантских полимеров с молекулярной массой в несколько миллионов.

Поистине замечательное свойство клеток — их способность соединять 20 аминокислот в различных комбинациях и последовательностях, в результате чего образуются белки с совершенно разными свойствами и биологической активностью. Из одних и тех же строительных блоков разные организмы способны создавать такие разнообразные продукты, как ферменты, гормоны, антитела, транспортные белки, мышечные волокна, белок хрусталика глаза, перья, паутина, рог носорога, белки молока, антибиотики, ядовитые вещества грибов и многие другие соединения, наделенные специфической биологической активностью (рис. 3-1). Среди этих белковых продуктов наиболее разнообразными и специализированными являются ферменты, которые катализируют практически все реакции в клетке.



а



б




в

Рис. 3-1. Некоторые функции белков. а) Свет, излучаемый светляком, возникает в результате реакции между белком люциферин и АТФ; реакцию катализирует фермент люцифераза (доп. 13-1). б) Эритроциты содержат большое количество белка гемоглобина, переносящего кислород. в) Белок кератин, синтезируемый всеми позвоночными, является основным структурным компонентом волос, чешуи, рогов, шерсти, ногтей и перьев. Черные носороги — исчезающий вид, поскольку у некоторых народов бытовало поверье, что его рог может оказывать возбуждающее действие. На самом деле химические свойства измельченного рога носорога ничем не отличаются от свойств измельченных бычьих копыт или человеческих ногтей.

Структура и функции белков обсуждаются в данной и последующих трех главах книги. Мы начнем с изучения основополагающих химических свойств аминокислот, пептидов и белков. Кроме того, мы рассмотрим принципы работы с белками.

3.1. Аминокислоты

 **Архитектура белка — аминокислоты.** Белки представляют собой полимерные молекулы, состоящие из аминокислот. Каждый **аминокислотный остаток** соединен с соседним остатком специфической ковалентной связью. Термин «остаток» подразумевает, что при соединении аминокислот друг с другом отщепляется молекула воды. Белки могут быть гидролизованы на составляющие их аминокислоты с помощью нескольких методов. Ранние исследования белков как раз были сфокусированы на определении аминокислот, образующихся при гидролизе белков. Обычно в белках можно обнаружить не более 20 различных аминокислот. Первая аминокислота аспарагин была открыта в 1806 г., последней в 1938 г. была идентифицирована аминокислота треонин. Каждая аминокислота имеет тривиальное (традиционное) название, часто оно происходит от источника, из которого она была впервые выделена. Аспарагин впервые обнаружили в аспарагусе, а глутаминовую кислоту —

в глютене (запасном белке) пшеницы. Тирозин выделили из сыра (название происходит от греч. *tyros* — сыр), а глицин был назван так за его сладкий вкус (от греч. *glycos* — сладкий).

Строение аминокислот. Общие закономерности

Все 20 аминокислот, из которых построены белки, — α -аминокислоты. Они имеют карбоксильную группу и аминогруппу, связанные с одним и тем же атомом углерода (α -атомом углерода) (**рис. 3-2**). Различаются аминокислоты заместителем (**R-группой**), электрическим зарядом и растворимостью в воде. Кроме 20 основных аминокислот существуют еще гораздо менее распространенные аминокислоты, некоторые из них образуются в процессе модификации остатков, происходящей уже после синтеза белка. Другие

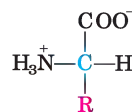


Рис. 3-2. Общая структура аминокислот. Данная структура является общей для всех аминокислот, кроме пролина — одной-единственной циклической аминокислоты. Каждая аминокислота имеет характерную R-группу (показана красным цветом), соединенную с α -атомом углерода (показан синим цветом).

присутствуют в живых организмах, но не в составе белков. Основные аминокислоты имеют трехбуквенные и однобуквенные условные обозначения (табл. 3-1), которыми пользуются для сокращенной записи состава и последовательностей аминокислот в белках.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Трехбуквенный код понять легко — сокращение обычно представляет собой первые три буквы названия аминокислоты. Однобуквенный код был разработан Маргарет Дейхофф (1925–1983), которую многие считают основоположницей современной биоинформатики. Однобуквенный код возник в результате



Маргарет Оукли Дейхофф, 1925–1983

попытки сократить размеры баз данных (в эру перфокарт), содержащих аминокислотные последовательности. Его легко запомнить, если понять происхождение символов. В случае шести аминокислот (CHIMSV) первая буква названия однозначно определяет только эти аминокислоты, поэтому именно она и используется в качестве символа для их обозначения. Для пяти других аминокислот (AGLPT) первая буква не однозначно определяющая, так что ее используют для обозначения той аминокислоты, которая чаще встречается в белках (например, лейцин встречается гораздо чаще, чем лизин). Коды для следующих четырех аминокислот выбраны по фонетическому созвучию (RFYW: aRginine, Fenylalanine, tYrosine, tWiptophan). Подобрать однобуквенный код для оставшихся аминокислот было сложнее. Четыре аминокислоты (DNEQ) получили свою букву по той причине, что она имеется в их названии или созвучна их названию (asparDic, asparagiNe, glutamEke, Q-tamine). Остался лизин, но и в алфавите осталось всего несколько незанятых букв. Для обозначения лизина была выбрана буква K, поскольку она расположена к L ближе остальных. ■

Во всех основных аминокислотах, за исключением глицина, α -атом углерода связан с четырьмя различными группами: карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, а также с атомом водорода (рис. 3-2; в глицине R-группа представляет собой атом водорода). Таким образом, α -углерод — это **хиральный центр** (с. 36). Поскольку связывающие орбитали α -атома углерода направлены к углам тетраэдра, четыре различных заместителя могут образовать две различные конфигурации, т. е. аминокислоты могут существовать в виде двух стереоизомеров. Эти структуры являются зеркальными отражениями друг друга и не совпадают при наложении (рис. 3-3); они называются **энантиомерами** (рис. 1-19).

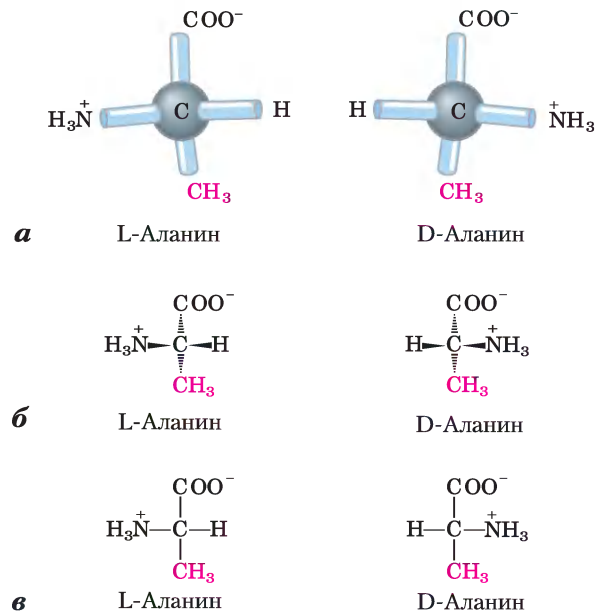


Рис. 3-3. Стереизомерия α -аминокислот. а) Два стереоизомера аланина L- и D-аланин являются зеркальными отражениями друг друга, не совпадающими при наложении, т. е. представляют собой энантиомеры. Существуют два способа изображать конфигурацию стереоизомеров. В перспективных формулах (б) полностью закрашенные клиновидные линии обозначают связи, находящиеся над поверхностью рисунка, а штриховкой показаны связи, лежащие под ней. В проекционных формулах (в) горизонтальными линиями изображают связи, находящиеся над поверхностью рисунка, а вертикальными линиями — лежащие под ней. Однако очень часто при написании проекционных формул группы располагают случайным образом, не задумываясь о специфической стереохимической конфигурации молекул.

Таблица 3–1 Свойства аминокислот, входящих в состав белков

Аминокислота	Сокращение/ символ	M_r^*	Значения pK_a			pI	ГИ**	Встречаемость в белках (%)***
			pK_1 (–COOH)	pK_2 (–NH ₃ ⁺)	pK_R (R-группы)			
Неполярные алифатические R-группы								
Глицин	Gly	G	75	2,34	9,60	5,97	20,4	7,2
Аланин	Ala	A	89	2,34	9,69	6,01	1,8	7,8
Пролин	Pro	P	115	1,99	10,96	6,48	1,6	5,2
Валин	Val	V	117	2,32	9,62	5,97	4,2	6,6
Лейцин	Leu	L	131	2,36	9,60	5,98	3,8	9,1
Изолейцин	Ile	I	131	2,36	9,68	6,02	4,5	5,3
Метионин	Met	M	149	2,28	9,21	5,74	1,9	2,3
Ароматические R-группы								
Фенилаланин	Phe	F	165	1,83	9,13	5,48	2,8	3,9
Тирозин	Tyr	Y	181	2,20	9,11	10,07	5,66	21,3
Триптофан	Trp	W	204	2,38	9,39	5,89	20,9	1,4
Полярные незаряженные R-группы								
Серин	Ser	S	105	2,21	9,15	5,68	20,8	6,8
Треонин	Thr	T	119	2,11	9,62	5,87	20,7	5,9
Цистеин****	Cys	C	121	1,96	10,28	8,18	5,07	2,5
Аспарагин	Asn	N	132	2,02	8,80	5,41	23,5	4,3
Глутамин	Gln	Q	146	2,17	9,13	5,65	23,5	4,2
Положительно заряженные R-группы								
Лизин	Lys	K	146	2,18	8,95	10,53	9,74	23,9
Гистидин	His	H	155	1,82	9,17	6,00	7,59	23,2
Аргинин	Arg	R	174	2,17	9,04	12,48	10,76	24,5
Отрицательно заряженные R-группы								
Аспарагиновая кислота	Asp	D	133	1,88	9,60	3,65	2,77	23,5
Глутаминовая кислота	Glu	E	147	2,19	9,67	4,25	3,22	23,5

* Значения M_r отражают строение соединения (рис. 3-5). При соединении аминокислот в полипептидную цепь отщепляются молекулы воды ($M_r = 18$).

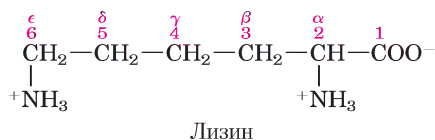
** Гидропатический индекс характеризует и гидрофобность, и гидрофильность R-группы и отражает ΔG переноса боковой цепи аминокислоты из гидрофобного растворителя в воду. Перенос благоприятен ($\Delta G < 0$; ГИ < 0) для заряженных или полярных цепей и неблагоприятен ($\Delta G > 0$; ГИ > 0) для аминокислот с неполярной или более гидрофобной боковой цепью; см. гл. 11. Цит. по Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105–132.

*** Результаты исследования 1150 белков. Цит. по Doolittle, R.F. (1989) Redundancies in protein sequences. In *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation* (Fasman, G.D., ed.), pp. 599–623, Plenum Press, New York.

**** Цистеин обычно рассматривают как полярную молекулу, несмотря на то что у него ГИ > 0 . Это отражает способность сульфгидрильной группы выступать в роли слабой кислоты и образовывать слабую водородную связь с кислородом или азотом.

Кроме того, все молекулы, имеющие хиральный центр, обладают **оптической активностью**, т. е. вращают плоскость поляризации плоскополяризованного света (доп. 1-2).

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Существуют две системы нумерации атомов углерода в молекулах аминокислот, что может поначалу сбивать с толку. Следующие за α -атомом атомы углерода в R-цепи обычно обозначают с помощью греческих букв β , γ , δ , ϵ и т. д. В случае большинства других органических молекул атомы углерода просто нумеруют по порядку, начиная с атома углерода (C-1), имеющего в качестве заместителя самую старшую функциональную группу. В соответствии с такой системой нумерации карбоксильный углерод в аминокислоте имеет номер C-1, а α -атом — номер C-2.



Иногда, например в случае аминокислот с гетероциклическими R-группами, греческая система обозначений может допускать двоякое толкование, и тогда лучше пользоваться числами. В случае аминокислот с разветвленной боковой цепью эквивалентные атомы углерода обозначают цифрами после греческих букв. Так, лейцин имеет атомы углерода $\delta 1$ и $\delta 2$ (см. рис. 3-5). ■

Для обозначения **абсолютной конфигурации** четырех заместителей у хирального (асимметрического) атома углерода применяется специальная номенклатура. Абсолютная конфигурация простых сахаров и аминокислот обозначается буквами **D** и **L** (рис. 3-4), по аналогии с абсолютной конфигурацией трехуглеродного глицеральдегида. Идея подобной классификации была предложена Эмилем Фишером в 1891 г. Фишер знал, какие группы окружают асимметрический атом углерода в молекуле глицеральдегида, но лишь догадывался относительно их абсолютной конфигурации; его догадка была позднее подтверждена методом рентгеноструктурного анализа. Во всех хиральных молекулах стереоизомеры с конфигурацией, соответствующей конфигурации L-глицеральдегида, обозначают буквой L, а стереоизомеры с кон-

фигурацией, соответствующей конфигурации D-глицеральдегида, обозначают буквой D. Например, чтобы привести в соответствие расположение функциональных групп в молекулах L-аланина и L-глицеральдегида, нужно одинаковым образом расположить те из них, которые можно превратить друг в друга путем простой одностадийной химической реакции. В таком случае карбоксильная группа L-аланина займет ту же позицию относительно хирального центра, что и альдегидная группа L-глицеральдегида, поскольку альдегид легко превращается в карбоксильную группу в одностадийной реакции окисления. Исторически сложилось так, что буквы *l* и *d* использовались также для обозначения левовращающих и правовращающих соединений (вращающих свет влево и вправо соответственно). Однако не все L-аминокислоты являются левовращающими, поэтому во избежание возможных ошибок, связанных с абсолютной конфигурацией, следует пользоваться номенклатурой Фишера (рис. 3-4). В соответствии с этой номенклатурой буквы L и D относятся *только* к абсолютной конфигурации четырех замещающих групп у хирального атома углерода и не имеют отношения к направлению вращения плоскости поляризации.



Рис. 3-4. Стереизомеры аланина и абсолютная конфигурация L- и D-глицеральдегида. В данных перспективных формулах атомы углерода расположены по вертикали, хиральный атом находится в центре. Атомы углерода пронумерованы, начиная с концевой атома в альдегидной или карбоксильной группе (выделены красным цветом), т. е. от 1 до 3 сверху вниз. При подобном расположении R-группа аминокислоты (в данном случае метильная группа аланина) всегда находится под α -атомом углерода. У L-аминокислот α -аминогруппа расположена слева, а у D-аминокислот — справа.

Еще одной системой обозначения конфигурации вокруг хирального центра является **R/S-система**. Она используется в систематической номенклатуре органических соединений, в частности наиболее удобно и точно описывает конфигурации молекул с несколькими хиральными центрами (см. с. 37).

Аминокислотные остатки в белках являются L-стереоизомерами

Почти все биологические молекулы с асимметрическим атомом углерода существуют в природе в форме только одного стереоизомера — либо D, либо L. Аминокислотные остатки в белках являются исключительно L-стереоизомерами. D-Аминокислотные остатки были обнаружены лишь в нескольких небольших пептидах, в частности в составе клеточной стенки бактерий и в некоторых пептидных антибиотиках.

Присутствие в белках только L-стереоизомеров аминокислот весьма примечательно, поскольку при лабораторном синтезе молекул с хиральным центром всегда получаются рацемические смеси L- и D-изомеров, которые трудно различить и разделить. Однако для живого организма L- и D-изомеры различаются, как правая и левая руки. Для образования устойчивых повторяющихся надмолекулярных белковых структур (гл. 4) обычно важно, чтобы составляющие их аминокислоты относились к одному стереохимическому ряду. Клетки умеют специфическим образом синтезировать исключительно L-изомеры аминокислот, поскольку активные центры соответствующих ферментов являются асимметрическими, а катализируемые ими реакции стереоспецифичны.

Классификация аминокислот на основании их R-групп

Химические свойства аминокислот положены в основу биохимии. Изучение аминокислот облегчается благодаря тому, что все аминокислоты можно разделить на пять основных классов в зависимости от свойств R-групп (табл. 3-1), в частности **полярности** или способности взаимодействовать с водой при физиологических значениях pH (около 7,0). Полярность R-групп варьирует в широких пределах — от неполяр-

ных и гидрофобных (нерастворимых в воде) до сильнополярных и гидрофильных (хорошо растворимых в воде).

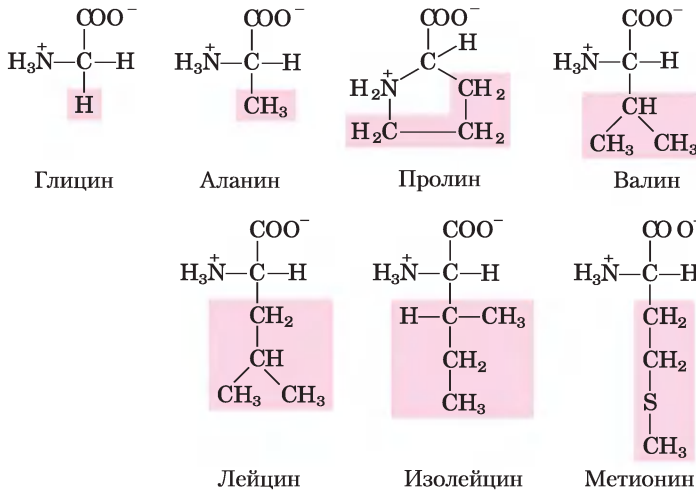
Строение 20 основных аминокислот показано на **рис. 3-5**, а некоторые свойства перечислены в табл. 3-1. Внутри каждого класса аминокислот существует определенная градация по полярности, размерам и форме R-групп.

Неполярные алифатические R-группы. В этих аминокислотах R-группы являются неполярными и гидрофобными. Боковые цепи **аланина**, **валина**, **лейцина** и **изолейцина** в белках в результате гидрофобных взаимодействий стремятся объединяться в кластеры, что стабилизирует структуру белка. **Глицин** отличается самым простым строением среди всех аминокислот. Хотя по формальным признакам он является неполярной молекулой, его слишком маленькая боковая цепь не вносит никакого реального вклада в гидрофобные взаимодействия. Одна из двух аминокислот, содержащих серу — **метионин** — в боковой цепи имеет неполярную тиоэфирную группу. Молекула **пролина** содержит алифатическую боковую цепь, образующую циклическую структуру. Аминогруппа (точнее, иминогруппа) пролина удерживается в жесткой конформации, что снижает гибкость полипептидных участков, содержащих остатки пролина.

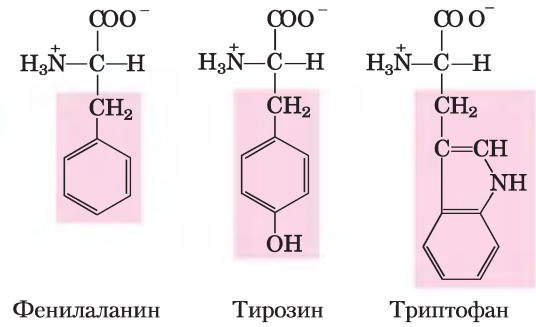
Ароматические R-группы. **Фенилаланин**, **тирозин** и **триптофан**, имеющие ароматические группы в боковой цепи, — относительно неполярные и гидрофобные молекулы. Все они могут участвовать в гидрофобных взаимодействиях. Гидроксильная группа тирозина может образовывать водородные связи и является важной функциональной группой в некоторых ферментах. Тирозин и триптофан гораздо более полярные, чем фенилаланин, что связано с наличием у тирозина гидроксильной группы, а у триптофана — индольного кольца.

Триптофан, тирозин и в меньшей степени фенилаланин способны поглощать УФ-свет (**рис. 3-6**, доп. 3-1), в результате чего большинство белков поглощают свет с длиной волны 280 нм. Это характерное свойство белков активно используется в биохимических исследованиях.

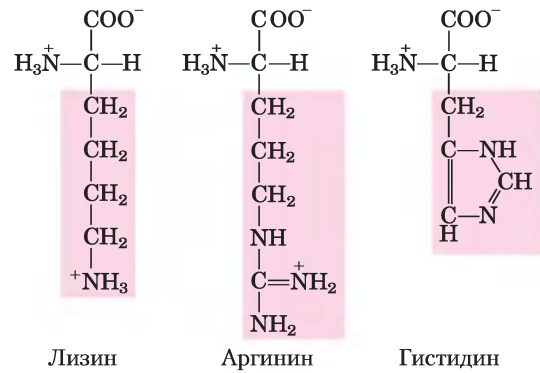
Неполярные алифатические R-группы



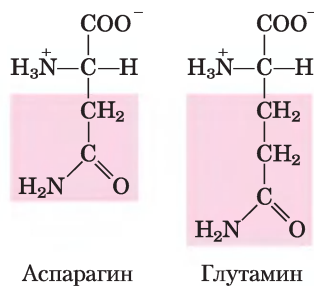
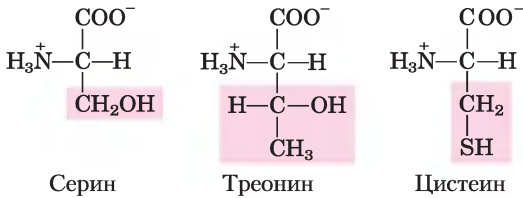
Ароматические R-группы



Положительно заряженные R-группы



Полярные незаряженные R-группы



Отрицательно заряженные R-группы

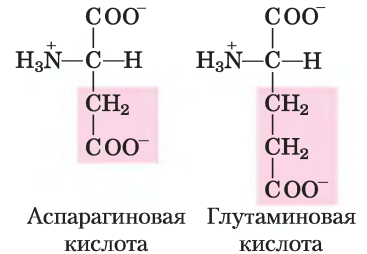


Рис. 3-5. Двадцать основных аминокислот, входящих в состав белков. Данные структурные формулы отражают состояние ионизации, в котором находится преобладающая часть молекул при pH 7,0. Не выделенная цветом область одинакова у всех аминокислот; розовым цветом выделены различающиеся области – боковые R-группы. Хотя R-группа гистидина изображена незаряженной, значение pK_a этой группы таково, что часть молекул гистидина при pH 7,0 заряжена положительно, хотя таких молекул не столь уж много (см. табл. 3-1). Протонированная форма гистидина показана на рис. 3-12, б.

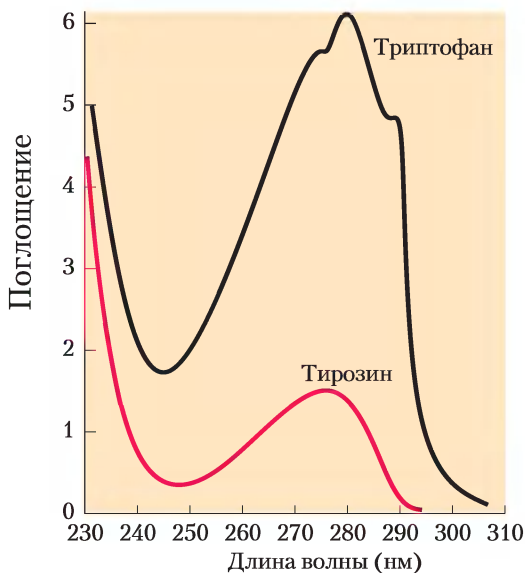


Рис. 3-6. Поглощение ультрафиолетового света ароматическими аминокислотами. Приведены спектры поглощения ароматических аминокислот триптофана и тирозина при pH 6,0. Кислоты были взяты в эквимольных количествах (10^{-3} М) и находились в идентичных условиях. Видно, что триптофан поглощает приблизительно в четыре раза сильнее тирозина. Заметьте, что максимумы поглощения обеих аминокислот расположены в области 280 нм. Поглощение ароматической аминокислоты фенилаланина (не показано) обычно оказывает лишь незначительное влияние на спектральные свойства белков.

Полярные незаряженные R-группы. Аминокислоты с такими R-группами лучше растворяются в воде, т. е. более гидрофильны, чем неполярные аминокислоты, поскольку способны образовывать с водой водородные связи. К этому классу аминокислот относятся **серин, треонин, цистеин, аспарагин и глутамин**. Полярность серина и треонина обеспечивается наличием в их молекулах гидроксильной группы, полярность цистеина — сульфгидрильной группой (которая является слабой кислотой и может образовывать водородные связи с атомами кислорода и азота), а аспарагина и глутамина — амидными группами.

Аспарагин и глутамин — амиды двух аминокислот, также входящих в состав белков — аспарагиновой и глутаминовой кислот, в которые они легко превращаются под действием кислот или оснований. Цистеин легко окисляется с образованием ковалентно сшитого димера, назы-

ваемого **цистином**, в котором два остатка цистеина соединены дисульфидной связью (рис. 3-7). Такие связанные сульфидными мостиками молекулы являются сильногидрофобными (неполярными). Дисульфидные мостики играют особую роль в структуре многих белков, поскольку образуют ковалентные сшивки между отдельными частями белковой молекулы или даже между разными полипептидными цепями.

Положительно заряженные (основные) R-группы. Группы, несущие положительный или отрицательный заряд, наиболее гидрофильны. К аминокислотам с большим положительным зарядом R-группы при pH 7,0 относятся **лизин**, несущий вторую аминогруппу в ϵ -положении алифатической цепи, **аргинин** с положительно заряженной гуанидиновой группой, а также **гистидин**, имеющий имидазольную группу. Гистидин является единственной аминокислотой, содержащей ионизированную боковую цепь с pK_a в нейтральной области, поэтому при pH 7,0 он может быть положительно заряжен (протонированная форма) или не заряжен. Остатки His участвуют во многих ферментативных реакциях, выступая в роли доноров или акцепторов электронов.

Отрицательно заряженные (кислые) R-группы. У двух аминокислот — **аспарагиновой** и **глутаминовой** — R-группы несут отрицательный заряд при pH 7,0; обе аминокислоты содержат по второй карбоксильной группе.

«Нестандартные» аминокислоты также выполняют важные функции

Кроме 20 «стандартных» (основных) аминокислот белки могут содержать аминокислотные остатки, образовавшиеся при модификации обычных аминокислот, уже включенных в полипептидную цепь (рис. 3-8, а). Среди этих «нестандартных» аминокислот следует назвать производное пролина **4-гидроксипролин** и производное лизина **5-гидроксилизин**. Оба этих соединения обнаружены в составе коллагена — фибриллярного белка соединительной ткани, а 4-гидроксипролин, кроме того, входит в состав белков клеточной стенки растений. В мышечном белке миозине, участвующем в сокращении мышц, присутствует **6-N-метиллизин**. Еще одна важная нестандартная

Дополнение 3–1 ПРАКТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ Поглощение света: закон Ламберта–Бера

Многие биомолекулы поглощают свет определенной длины волны (например, см. спектр поглощения триптофана, рис. 3-6). Поглощение света, измеряемое с помощью спектрофотометра, используют для обнаружения и идентификации веществ, а также для определения их концентрации в растворе. Поглощение света пропорционально толщине поглощающего слоя (длине светового пути) и концентрации вещества (рис. 1). Математически это правило выражается законом Ламберта–Бера: $\lg(I/I_0) = \epsilon cl$, где I_0 – интенсивность падающего света, I – интенсивность прошедшего света, ϵ – коэффициент молярной экстинкции (в единицах л/(моль · см)), c – концентрация вещества (моль/л), а l – толщина поглощающего слоя (см). Закон Ламберта–Бера выполняется для монохроматического света (свет с определенной длиной волны), причем поглощение света обусловлено мо-

лекулами растворителя и молекулами растворенного вещества, ориентированных случайным образом. Выражение $\lg(I/I_0)$ называется **поглощением** и обозначается буквой A (от англ. *absorbance*).

Важно отметить, что при прохождении света через поглощающий слой толщиной 1 см каждый следующий миллиметр пути поглощает не одно и то же постоянное количество света, а постоянную долю интенсивности попадающего в него света. Однако при фиксированной длине пути луча света *поглощение (A) прямо пропорционально концентрации вещества*.

Коэффициент молярной экстинкции зависит от природы вещества, растворителя и длины волны, а также от pH, если поглощающее вещество может существовать в нескольких состояниях ионизации, имеющих разное светопоглощение.

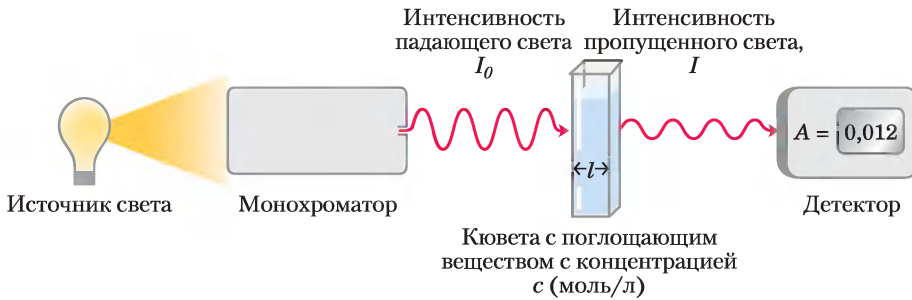


Рис. 1. Принципиальная схема спектрофотометра. Источник света излучает в широком диапазоне длин волн, однако монохроматор пропускает свет только определенной длины волны. Монохроматический свет проходит через образец, помещенный в кювету толщиной l , где поглощается (пропорционально концентрации c вещества). Пршедший сквозь кювету свет имеет меньшую интенсивность, которая измеряется с помощью детектора.

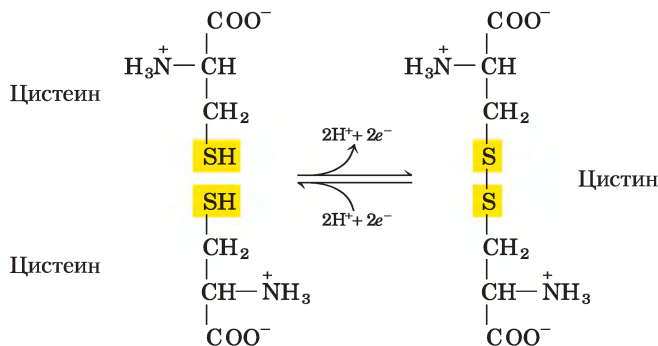


Рис. 3-7. Обратимая реакция образования дисульфидной связи при окислении двух молекул цистеина. Дисульфидный мостик между остатками цистеина стабилизируют многие белковые структуры.

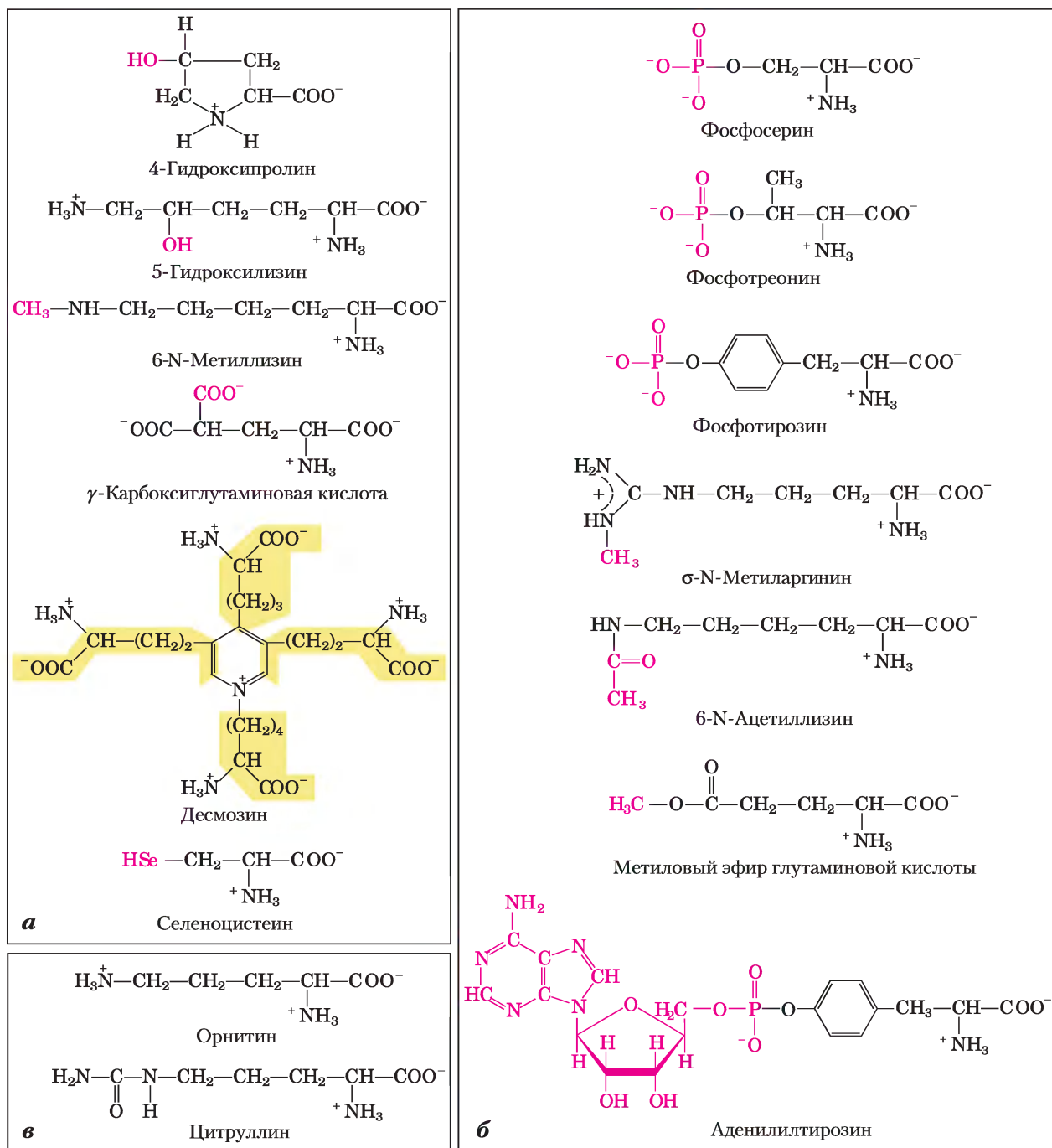


Рис. 3-8. «Нестандартные» аминокислоты. *а*) В составе белков обнаружено несколько нестандартных аминокислот, образующихся при модификации основных аминокислот. Красным цветом выделены функциональные группы, появляющиеся в результате модификации. Молекула десмозина образуется из четырех остатков лизина (выделены желтым цветом). Обратите внимание, что для обозначения атомов углерода в таких структурах используют цифры или греческие буквы. *б*) Обратимо модифицированные аминокислоты, использующиеся при регуляции активности белков. Наиболее частый метод модификации — фосфорилирование. *в*) Орнитин и цитруллин не встречаются в белках, а являются интермедиатами в биосинтезе аргинина и в цикле мочевины.

аминокислота — это **γ-карбокситглутаминовая кислота**, обнаруженная в протромбине (белке, участвующем в процессе свертывания крови), а также в некоторых других белках, которые, как и протромбин, при выполнении своей биологической функции связывают ионы Ca^{2+} . Более сложным строением отличается аминокислота **десмозин** (производное лизина), найденная в фибриллярном белке эластине.

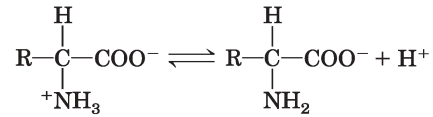
Следует сказать несколько слов о **селеноцистеине**. Эта редкая аминокислота возникает не в результате модификации вновь синтезированной белковой цепи, а встраивается в нее в процессе синтеза. В отличие от цистеина селеноцистеин содержит не серу, а селен. Эта аминокислота является на самом деле производным серина и обнаружена пока лишь в небольшом числе белков.

Некоторые остатки аминокислот в белке могут быть модифицированы «на время», чтобы изменить работу этого белка. Добавление фосфатной, метильной, ацетильной, аденильной, ADP-рибозильной или других групп к определенным остаткам аминокислот может усилить или снизить активность белка (рис. 3-8, б). Самая частая регуляторная модификация — это фосфорилирование. Изменения ковалентных связей как способ регуляции более подробно обсуждается в гл. 6.

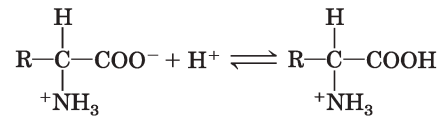
Кроме того, в клетках найдено еще около 300 аминокислот. Они выполняют множество различных функций, но не входят в состав белков. **Орнитин** и **цитруллин** (рис. 3-8, в) заслуживают отдельного упоминания, поскольку являются ключевыми метаболитами в биосинтезе аргинина (гл. 22) и в цикле мочевины (гл. 18).

Аминокислоты могут действовать как кислоты или основания

Аминогруппы и карбоксильные группы аминокислот, а также ионизируемые R-группы некоторых аминокислот выступают в роли слабых кислот и оснований. В водном растворе с нейтральным значением pH аминокислоты, не имеющие ионизируемой R-группы, присутствуют в виде биполярных ионов, или **цвиттер-ионов** (от нем. *гибридный ион*; рис. 3-9). Вещества с такой двойственной природой являются **амфотерными** (от греч. *amphi* — оба) и часто называются **амфолитами** (сокращение от «амфотерные электро-



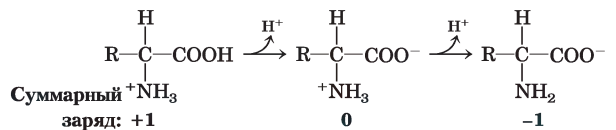
Цвиттер-ион как кислота



Цвиттер-ион как основание

Рис. 3-9. Неионная и биполярная формы аминокислот. Неионная форма практически отсутствует в водном растворе; при нейтральном значении pH преобладает биполярная форма (цвиттер-ион). Цвиттер-ион может выступать и как кислота (донор протона), и как основание (акцептор протона).

литы»). Простая моноаминомонокарбоновая α-аминокислота, такая как аланин, по существу представляет собой двухосновную кислоту, когда находится в полностью протонированной форме, т. е. когда протон присоединен и к карбоксильной группе, и к аминогруппе. В таком случае кислота при диссоциации может отдавать два протона:



Аминокислоты имеют характерные кривые титрования

Суть процесса кислотно-основного титрования состоит в постепенном добавлении или удалении протонов (гл. 2). На рис. 3-10 приведена кривая титрования полностью протонированного глицина. Две ионизируемые группы глицина — карбоксильную группу и аминогруппу — можно оттитровать с помощью сильного основания, такого как NaOH. Кривая титрования имеет два хорошо различимых участка, соответствующих депротонированию двух разных групп в молекуле

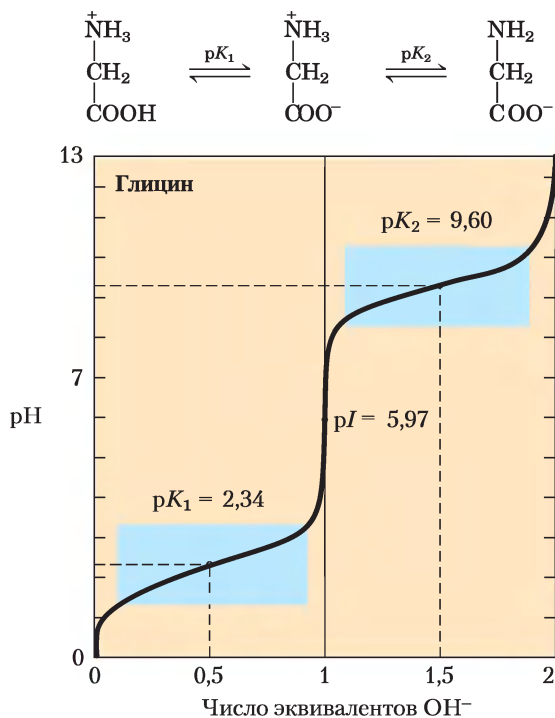


Рис. 3-10. Кривая титрования аминокислоты. Представлена кривая титрования 0,1 М раствора глицина при 25 °С. Над соответствующей областью кривой приведены ионные формы, преобладающие при данном значении рН. Голубым цветом выделены области с максимальной буферной емкостью (участки кривой, близкие к значениям $pK_1 = 2,34$ и $pK_2 = 9,60$). Обратите внимание, что 1 эквивалент OH^- соответствует добавлению 0,1 М NaOH .

глицина. Каждая часть кривой в отдельности напоминает по форме кривую титрования одноосновной кислоты, например уксусной (рис. 2-16), и может быть проанализирована тем же способом. При очень низких значениях рН глицин преимущественно существует в полностью протонированном состоянии — $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$. В средней точке первой стадии титрования, на которой $-\text{COOH}$ -группа теряет свой протон, наблюдается равенство молярных концентраций донора протонов ($^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$) и акцептора протонов ($^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$). рН в средней точке титрования (в точке перегиба) численно равно pK_a титруемой протонированной группы (рис. 2-17). В случае глицина значение рН в средней точке 2,34, откуда следует, что pK_a $-\text{COOH}$ -группы глицина равно 2,34 (pK_1 на рис. 3-10). Мы обсуждали в гл. 2, что рН и pK_a удобны для обозначения концентрации протонов и констан-

ты равновесия реакции ионизации. Константа pK_a отражает способность группы отдавать свой протон; если эта способность снижается в 10 раз, то pK_a увеличивается на 1. При продолжении титрования мы достигаем следующей важной точки при рН 5,97. В этой точке перегиба кривой заканчивается удаление первого протона и начинается удаление второго. При таком значении рН глицин в основном существует в форме биполярного иона $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ (цвиттер-иона). Позднее мы кратко обсудим эту точку перегиба (рI на рис. 3-10).

Вторая стадия титрования соответствует удалению протона с $-\text{NH}_3^+$ группы глицина. Средняя точка этой стадии титрования приходится на рН 9,60, следовательно, pK_a данной группы глицина (pK_2 на рис. 3-10) составляет 9,60. Титрование практически заканчивается при рН 12; на этом этапе преобладающей формой глицина является $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$.

Из кривой титрования глицина мы можем извлечь ряд ценных сведений. Прежде всего, она дает нам численные значения pK_a обеих ионизируемых групп: 2,34 для группы $-\text{COOH}$ и 9,60 для группы $-\text{NH}_3^+$. Заметьте, что карбоксильная группа глицина в 100 с лишним раз более кислотная (легче ионизируется), чем карбоксильная группа уксусной кислоты, которая, как было показано в гл. 2, имеет pK_a 4,76 (это среднее значение pK_a карбоксильной группы, соединенной с алифатической цепью, не имеющей других заместителей). Такое значительное отличие pK_a глицина объясняется отталкиванием между уходящим протоном и расположенной поблизости положительно заряженной аминогруппой у α -атома углерода (рис. 3-11). Противоположные заряды на образующемся цвиттер-ионе стабилизируют молекулу, что сдвигает равновесие реакции дальше вправо. Аналогично, значение pK_a аминогруппы глицина ниже, чем pK_a других аминогрупп. Этот эффект частично связан с наличием в карбоксильной группе молекулы электроотрицательных атомов кислорода, оттягивающих на себя электроны, это способствует тому, что аминогруппа хочет отдать протон. В результате α -аминогруппа в аминокислоте имеет более низкое значение pK_a по сравнению с pK_a алифатических аминов, например pK_a метиламина (рис. 3-11). Короче говоря, pK_a любой функциональной группы сильно зависит от химического строения молекулы. Данный прин-

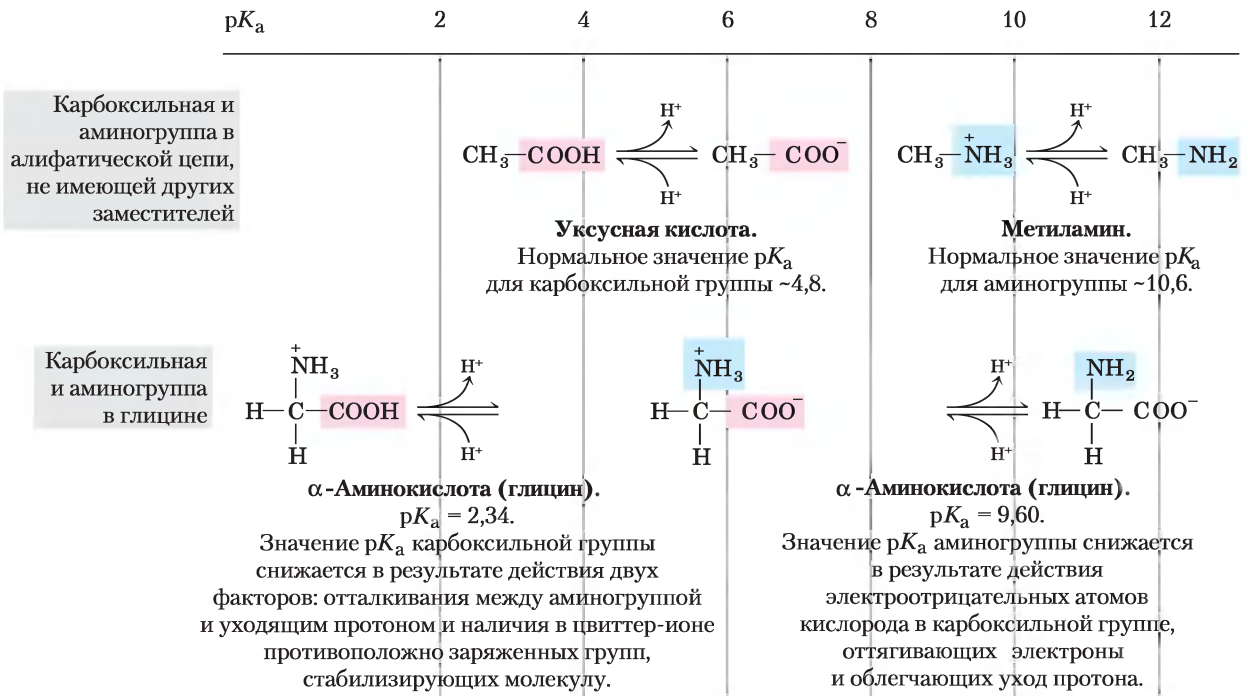


Рис. 3-11. Влияние химического строения молекулы на значение pK_a . Значение pK_a ионизируемых групп в глицине ниже соответствующих значений amino- и карбоксильных групп, связанных с алифатической цепью, не имеющей других заместителей. Изменение численных значений pK_a объясняется внутримолекулярными взаимодействиями. Похожий эффект достигается при близости определенных групп соседних молекул, как это происходит в активном центре фермента.

цип часто реализуется в активных центрах ферментов, где измененные значения pK_a донорных или акцепторных групп определенных аминокислотных остатков позволяют осуществить специфические реакции.

Еще один важный факт, который можно извлечь из кривой титрования глицина, состоит в том, что эта аминокислота оказывает буферное действие в двух разных областях pH. Первая буферная зона ограничивается сравнительно плоским участком кривой по обе стороны pK_a диссоциации глицина по первой ступени (т. е. глицин может использоваться в качестве буфера в области $pH\ 2,34 \pm 1$). Вторая буферная зона — в области $pH\ 9,6$. Заметьте, что глицин не может служить буфером при $pH\ \sim 7,4$, характерном для межклеточной жидкости и крови. Используя уравнение Хендерсона–Хассельбаха (с. 98), можно рассчитать, в каком соотношении нужно взять протонодонорные и протонакцепторные формы глицина, чтобы приготовить буфер с определенным значением pH.

По кривой титрования можно предсказать электрический заряд аминокислоты

Кривые титрования, кроме прочего, содержат информацию о соотношении между суммарным электрическим зарядом молекулы и значением pH раствора. В точке перегиба на кривой титрования (при $pH\ 5,97$) глицин в основном присутствует в виде биполярного иона, полностью ионизованного, но с суммарным электрическим зарядом, равным нулю (рис. 3-10). Значение pH, при котором общий заряд молекулы равен нулю, называется *изоэлектрической точкой* и обозначается pI . В случае глицина, не имеющего других ионизируемых групп, значение изоэлектрической точки рассчитывается как среднее арифметическое двух pK_a :

$$pI = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2) = \frac{1}{2}(2,34 + 9,60) = 5,97$$

Как видно из рис. 3-10, при любом значении pH выше значения pI молекула глицина имеет суммарный отрицательный заряд и в электрическом

поле движется в сторону положительного электрода (анода). При любом значении pH ниже pI молекула глицина заряжена положительно и движется в сторону отрицательного электрода (катода). Чем дальше значение pH раствора глицина от его изоэлектрической точки, тем больше суммарный заряд молекул глицина. Например, при pH 1,0 почти весь глицин существует в форме $^+H_3N-CH_2-COOH$ с суммарным зарядом 1,0. При pH 2,34, когда мы имеем дело со смесью равных количеств $^+H_3N-CH_2-COOH$ и $^+H_3N-CH_2-COO^-$, средний или суммарный положительный заряд молекул равен 0,5. Аналогичным образом можно предсказать знак и величину заряда любой аминокислоты при любом значении pH.

Аминокислоты различаются по кислотно-основным свойствам

Благодаря сходству многих аминокислот можно сделать некоторые обобщения и упрощения, касающиеся их кислотно-основных свойств. Все аминокислоты, содержащие одну α -аминогруппу, одну α -карбоксильную группу и неионизируемую R-группу, имеют кривые титрования, сход-

ные с кривой титрования глицина (рис. 3-10). У этих аминокислот близкие, хотя и не одинаковые, значения pK_a : для $-COOH$ группы — в диапазоне от 1,8 до 2,4, а для $-NH_3^+$ группы — от 8,8 до 11,0 (табл. 3-1). Различия в значениях pK_a определяются влиянием R-групп. У аминокислот с ионизируемой R-группой более сложные кривые титрования, имеющие *три* стадии, соответствующие трем возможным состояниям ионизации. Такие аминокислоты характеризуются тремя значениями pK_a . Стадия, соответствующая титрованию R-группы, в какой-то степени сливается с двумя другими. На **рис. 3-12** приводятся кривые титрования двух аминокислот данного типа — глутаминовой кислоты и гистидина. Изоэлектрические точки таких аминокислот определяются R-группой. Например, глутаминовая кислота имеет $pI = 3,22$, т. е. значительно ниже, чем у глицина. Это связано с наличием в молекуле двух карбоксильных групп, которые при pH 3,22 (среднее двух pK_a для двухступенчатой диссоциации) создают на молекуле суммарный заряд -1 , уравновешивающий заряд $+1$ на аминогруппе. Аналогичным образом, pI гистидина, имеющего в протонированной форме две положительно заряженные группы, составляет 7,59 (среднее pK_a

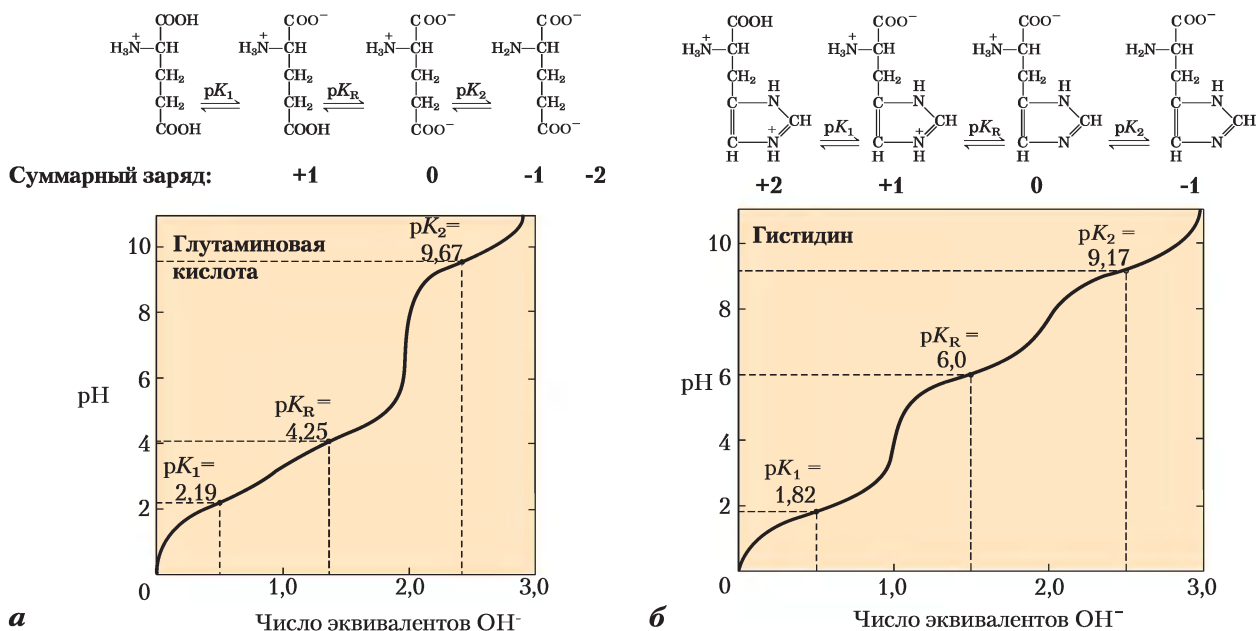


Рис. 3-12. Кривые титрования глутаминовой кислоты (а) и гистидина (б). Значения pK_a R-групп обозначены как pK_R .

аминогруппы и имидазольной группы), т. е. гораздо выше, чем у глицина.

Наконец, следует еще раз напомнить, что лишь одна аминокислота гистидин содержит R-группу ($pK_a = 6,0$), обеспечивающую значительную буферную емкость при нейтральных значениях pH, характерных для внутри- и внеклеточных жидкостей большинства бактериальных и животных клеток (табл. 3-1).

Краткое содержание раздела 3-1 АМИНОКИСЛОТЫ

- Двадцать основных аминокислот, встречающихся в белках, содержат α -карбоксильную группу, α -аминогруппу и характерную R-группу у α -атома углерода. α -Атом углерода у всех аминокислот, за исключением глицина, является асимметрическим, в результате чего все аминокислоты могут существовать в виде двух стереоизомеров. Однако в белках обнаружены лишь L-стереоизомеры, пространственная конфигурация которых соответствует абсолютной конфигурации L-глицеральдегида (который принят за стандартное соединение).
- Другие, гораздо более редкие, аминокислоты также могут встречаться в составе белков (где они образуются в результате модификации обычных аминокислот после завершения белкового синтеза) или в качестве свободных метаболитов.
- На основании полярности и заряда R-групп (при pH 7,0) все аминокислоты подразделяют на пять классов.
- Аминокислоты различаются по кислотно-основным свойствам и характеризуются кривыми титрования. Моноаминомонокарбоновые аминокислоты с неионизируемой R-группой при низких значениях pH являются двухосновными ($^+H_3NCH(R)COOH$), а по мере повышения pH образуют различные ионные формы. Аминокислоты с ионизируемой R-группой имеют дополнительные ионные формы в зависимости от pH среды и значения pK_a R-группы.

3.2. Пептиды и белки

Теперь мы обратимся к рассмотрению полимерных молекул, построенных из аминокислот, — **пептидов** и **белков**. В природе существуют полипептиды самого разного размера, состоящие из двух-трех или из тысяч аминокислотных остатков. Мы сосредоточим свое внимание на основных химических свойствах этих полимерных молекул.

Пептиды — это цепочки из аминокислот

Две одинаковые или разные аминокислоты могут ковалентно связываться друг с другом при помощи замещенной амидной связи, называемой **пептидной связью**, с образованием дипептида. Пептидная связь возникает в результате отщепления молекулы воды от α -карбоксильной группы одной аминокислоты и α -аминогруппы другой (рис. 3-13). Образование пептидной связи относится к реакциям конденсации, широко распространенным в живых клетках. В стандартных биохимических условиях равновесие реакции, приведенной на рис. 3-13, смещено в сторону образования аминокислот, а не дипептида. Эта реакция стала бы термодинамически более выгодной, если карбоксильная группа модифицирована или активирована таким образом, чтобы облегчить уход гидроксильной

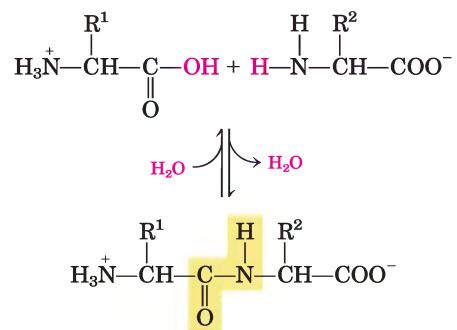


Рис. 3-13. Образование пептидной связи в реакции конденсации. α -Аминогруппа одной аминокислоты (с группой R^2) выступает в качестве нуклеофила и замещает гидроксильную группу другой аминокислоты (с группой R^1), в результате чего образуется пептидная связь (выделена желтым цветом). Аминогруппы являются хорошими нуклеофилами, но гидроксил – плохая уходящая группа, и ее не так просто заместить. Поэтому при физиологических значениях pH изображенная здесь реакция практически не происходит.

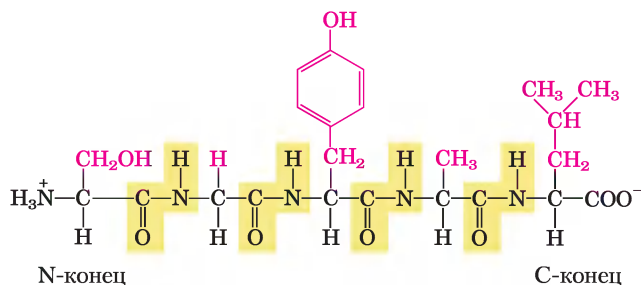


Рис. 3-14. Пентапептид серил-глицил-тирозил-аланил-лейцин (Ser-Gly-Tyr-Ala-Leu). Названия пептидов образуются из названий аминокислот, начиная с N-концевого остатка, который принято располагать слева. Пептидные связи выделены желтым цветом, а R-группы показаны красным цветом.

группы. Химический метод решения этой задачи будет рассмотрен далее в настоящей главе, а биологические пути ее решения являются основным предметом обсуждения в гл. 27.

Три аминокислоты могут соединиться с помощью двух пептидных связей и образовать трипептид; точно так же можно получить тетрапептиды, пентапептиды и т. д. Несколько аминокислотных остатков, соединенных таким образом в цепочки, образуют **олигопептиды**. При соединении большого числа аминокислот получаются **полипептиды**. В белках может содержаться несколько тысяч аминокислотных остатков. Термины «белок» и «полипептид» иногда взаимозаменяемы, но все же полипептидами скорее следует называть молекулы с молекулярной массой до 10 000, а белками — более крупные молекулы.

На **рис. 3-14** представлена структура пентапептида. Как уже говорилось ранее, аминокислотные звенья в пептидах часто называют остатками, поскольку они представляют собой части молекул аминокислот, оставшиеся после ухода атома водорода из аминогруппы и гидроксильной группы. Аминокислотный остаток, находящийся на том конце пептида, где расположена свободная α -аминогруппа, называется **N-концевым** (или аминоконцевым) остатком, а остаток на противоположном конце цепи, несущем свободную карбоксильную группу, — **C-концевым** (или карбоксиконцевым) остатком.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. При изображении аминокислотной последовательности пептида, полипептида или белка N-конец принято размещать слева, а C-конец справа. Последовательность читают слева направо, начиная с N-конца. ■

Гидролиз пептидной связи является экзергоническим процессом, однако он протекает медленно из-за высокой энергии активации (см. с. 48). В результате пептидные связи в белках довольно стабильны и в стандартных условиях внутри клетки имеют среднее время полураспада ($t_{1/2}$) около семи лет.

Пептиды различаются по способности переходить в ионную форму

В молекуле пептида только одна свободная α -аминогруппа и одна свободная α -карбоксильная группа, которые расположены на противоположных концах пептидной цепи (**рис. 3-15**). Эти группы могут ионизироваться в пептидах так же, как и в свободных аминокислотах, однако с другими константами диссоциации, поскольку в пептиде эти заряженные группы больше не связаны с α -атомом углерода. Что же касается α -амино- и α -карбоксильных групп остальных аминокислот, связанных ковалентными пептидными связями, то они не вносят никакого вклада в кислотно-основные свойства пептидов, поскольку уже не способны к ионизации. Однако R-группы некоторых аминокислот могут быть ионизованы (табл. 3-1), что вносит определенный вклад в общие кислотно-основные свойства молекулы (**рис. 3-15**). Таким образом, кислотно-основные свойства пептида в целом можно предсказать, исходя из наличия на его концах одной свободной α -аминогруппы и одной свободной α -карбоксильной группы, а также природы и числа ионизируемых R-групп.

Подобно аминокислотам, пептиды имеют характерные кривые титрования и значения изоэлектрических точек, т. е. значения рН, при кото-

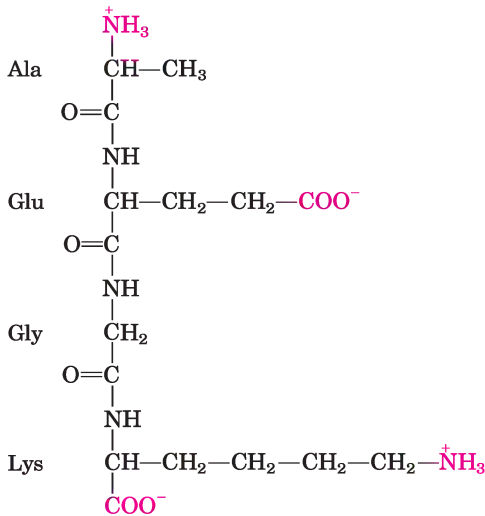


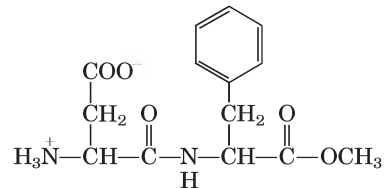
Рис. 3-15. Аланил-глутамил-глицил-лизин. Этот тетрапептид имеет одну свободную α -аминогруппу и одну свободную α -карбоксылную группу, а также две ионизируемые R-группы. Красным цветом выделены группы, ионизированные при pH 7,0.

рых они не движутся в электрическом поле. Эти свойства используются в некоторых методах разделения пептидов и белков, как мы покажем далее в данной главе. Следует еще раз подчеркнуть, что значения pK_a ионизируемых групп в свободной аминокислоте и аминокислоте в составе пептида могут различаться. В пептиде на величину pK_a влияют потеря заряда на α -амино- и α -карбоксылной

группе, взаимодействия с другими R-группами пептида, а также другие факторы изменившегося окружения. Приведенные в табл. 3-1 значения pK_a R-групп можно использовать только для оценки диапазона pH, при котором эти группы могут быть ионизированы, а не как точные значения pK_a R-групп в пептидах.

Биологически активные пептиды и полипептиды сильно различаются по размерам и составу

Не существует никакой зависимости между размером пептидов и белков и их биологической активностью. Природные пептиды имеют размеры от двух до нескольких тысяч аминокислотных остатков, причем биологической активностью могут обладать даже малые белковые молекулы. В качестве примера можно привести искусственно синтезированный дипептид метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина, использующийся в качестве заменителя сахара и более широко известный под торговым названием аспартам или Нутрасвит.



метиловый эфир L-аспартил-L-фенилаланина (аспартам)

Таблица 3-2 Молекулярные характеристики некоторых белков

	Молекулярная масса	Число остатков	Число цепей
Цитохром с (человека)	12 400	104	1
Рибонуклеаза А (из поджелудочной быка)	13 700	124	1
Лизоцим (из яичного белка)	14 300	129	1
Миоглобин (из сердца лошади)	16 700	153	1
Химотрипсин (из поджелудочной быка)	25 200	241	3
Химотрипсиноген (быка)	25 700	245	1
Гемоглобин (человека)	64 500	574	4
Сывороточный альбумин (человека)	66 000	609	1
Гексокиназа (дрожжей)	107 900	972	2
РНК-полимераза (<i>E. coli</i>)	450 000	4 158	5
Аполипопротеин В (человека)	513 000	4 536	1
Глутаминсинтетаза (<i>E. coli</i>)	619 000	5 628	12
Титин (человека)	2 993 000	26 926	1

Многие небольшие пептиды оказывают действие при очень низких концентрациях. Например, гормоны позвоночных животных (гл. 23) являются небольшими пептидами. К ним относятся окситоцин (9 аминокислотных остатков), секретин задней долей гипофиза и стимулирующий сокращения матки; тиролиберин (3 остатка), образующийся в гипоталамусе и стимулирующий высвобождение другого гормона — тиреотропина — из передней доли гипофиза. Небольшими пептидами являются некоторые очень токсичные грибные яды (аманитин) и многие антибиотики.

Какова длина пептидных цепей в белках? Как видно из табл. 3-2, этот параметр изменяется в широких пределах. Человеческий цитохром *c* состоит из 104 остатков, соединенных в одну цепь; химотрипсиноген быка состоит из 245 остатков. Гигантский белок титин, входящий в состав мышц позвоночника, содержит около 27 000 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу около 3 000 000. Преобладающее большинство природных белков имеют гораздо меньшие размеры, чем титин, и содержат обычно менее 2000 аминокислотных остатков.

Некоторые белки построены из единственной полипептидной цепи, другие, называемые **мультисубъединичными** белками, содержат две или несколько нековалентно связанных между собой цепей (табл. 3-2). Цепи в мультисубъединичных белках могут быть как одинаковыми, так и различными. Если хотя бы две цепи в белке идентичны, то такой белок называют **олигомерным**, а идентичные субъединицы (в свою очередь состоящие из одной или нескольких цепей) — **протомерами**. Например, гемоглобин состоит из четырех полипептидных субъединиц: двух идентичных α -цепей и двух идентичных β -цепей, удерживаемых в едином комплексе нековалентными взаимодействиями. Обе α -субъединицы идентичным образом образуют пары с β -субъединицами, так что гемоглобин можно рассматривать как тетрамер, состоящий из четырех полипептидных цепей, или как димер $\alpha\beta$ -протомеров.

В некоторых белках полипептидные цепи связаны ковалентной связью. Например, две полипептидные цепи в молекуле инсулина связаны между собой дисульфидными мостиками. В подобных случаях отдельные полипептиды рассматривают не как субъединицы, а просто как полипептидные цепи.

Таблица 3-3 Аминокислотный состав двух белков

Аминокислота	Число остатков в молекуле белка*	
	Цитохром <i>c</i> быка	Химотрипсиноген быка
Ala	6	22
Arg	2	4
Asn	5	14
Asp	3	9
Cys	2	10
Gln	3	10
Glu	9	5
Gly	14	23
His	3	2
Ile	6	10
Leu	6	19
Lys	18	14
Met	2	2
Phe	4	6
Pro	4	9
Ser	1	28
Thr	8	23
Trp	1	8
Tyr	4	4
Val	3	23
Всего	104	245

* В таких методах анализа, как кислотный гидролиз, Asp и Asn практически нельзя различить, поэтому их объединяют и обозначают как Asx (или V). Аналогичным образом, нельзя различить Glu и Gln, которые обозначают как Glx (или Z). Кроме того, при кислотном гидролизе полностью разрушается Trp. Для определения точного аминокислотного состава необходимо использовать дополнительные методы анализа.

Аминокислотный состав белков весьма разнообразен. Двадцать основных аминокислот практически никогда не встречаются в белках в равной пропорции. Некоторые аминокислоты могут встречаться лишь однажды, а могут в данном типе белков и вообще не встречаться, другие могут присутствовать в большом количестве. В табл. 3-3 отражен аминокислотный состав цитохрома *c* быка и химотрипсиногена быка — неактивного предшественника пищеварительного фермента химотрипсина. Эти два белка, имеющие совершенно разные функции, сильно различаются по своему аминокислотному составу.

Таблица 3-4 Сложные белки		
Класс	Протетическая группа	Пример
Липопротеины	Липиды	β 1-Липопротеин крови
Гликопротеины	Углеводы	Иммуноглобулин G
Фосфопротеины	Фосфатные группы	Казеин молока
Гемопроотеины	Гем (комплекс железа с протопорфирином)	Гемоглобин
Флавопротеины	Флавиновые нуклеотиды	Сукцинатдегидрогеназа
Металлопротеины	Железо	Ферритин
	Цинк	Алкогольдегидрогеназа
	Кальций	Кальмодулин
	Молибден	Нитрогеназа
	Медь	Пластоцианин

Для оценки числа аминокислотных остатков в белке, не содержащем компонентов другой химической природы, его молекулярную массу следует разделить на 110. Поясним, откуда это число. Для двадцати основных аминокислот средняя молекулярная масса составляет 138, однако в белках преобладают более легкие аминокислоты. Если учесть вклад различных аминокислот в построение белковых цепей (табл. 3-1), то средняя молекулярная масса аминокислоты, входящей в состав белка, окажется равной приблизительно 128. Поскольку при образовании каждой пептидной связи теряется одна молекула воды ($M_r = 18$), средняя молекулярная масса аминокислотного остатка составляет $128 - 18 = 110$.

Некоторые белки имеют в составе не только аминокислотные остатки, но и другие группы

Многие белки, например ферменты рибонуклеаза А и химотрипсиноген, содержат в молекуле только аминокислотные остатки и не имеют никаких других химических компонентов; их называют простыми белками. Однако есть белки, которые кроме аминокислот содержат и другие химические группы; их называют **сложными белками**. Неаминокислотную часть сложного белка называют **протетической группой**. Сложные белки классифицируют в соответствии с химической природой протетических групп (табл. 3-4). Например, **липопротеины** содержат липиды, **гликопротеины** имеют в своем составе сахара, а **металлопротеины** — определенные металлы. Некоторые белки

содержат несколько протетических групп. Обычно протетическая группа играет важную роль при выполнении биологических функций белка.

Краткое содержание раздела 3.2 ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ

- Аминокислоты могут соединяться с помощью ковалентных пептидных связей, образуя пептиды и белки. В клетках обычно содержится несколько тысяч различных белков, каждый из которых обладает характерной биологической активностью.
- Некоторые белки представляют собой очень длинные полипептидные цепи, содержащие от 100 до нескольких тысяч аминокислотных остатков, однако существуют также природные пептиды, состоящие всего лишь из нескольких аминокислот. Некоторые белки образованы несколькими нековалентно связанными полипептидными цепями, называемыми субъединицами. В результате гидролиза простых белков образуется смесь аминокислот. Сложные белки, кроме того, содержат компоненты другой химической природы, например ионы металлов или органические протетические группы.
- Аминокислотная последовательность является важной характеристикой белка и называется его первичной структурой. Это первый уровень из четырех уровней организации белковых молекул.

3.3. Как работать с белками

Наши представления о структуре и функции белка основаны на результатах исследований множества различных белков. Для проведения таких исследований биохимик должен уметь отделить свой белок от других и владеть методами, позволяющими изучать его свойства. Совокупность таких экспериментальных методов и составляет суть учебного предмета «химия белка» — дисциплины старой, как сама биохимия, и занимающей одно из центральных мест в биохимических исследованиях.

Белки можно разделить и очистить

Прежде чем приступить к изучению свойств белка, необходимо получить его чистый препарат. Как это сделать, если клетки содержат тысячи различных белков? Методы разделения основаны на том, что все белки различаются по размерам молекулы, заряду и способности связываться с другими веществами. Некоторые другие современные методы, включая клонирование ДНК и секвенирование геномов, могут упростить проведение очистки белка (см. гл. 9).

Обычно источником белка служат ткани или микробные клетки. Первой стадией любого метода выделения белка является разрушение клеток, в результате белки переходят в раствор, называемый **грубым экстрактом**. Для извлечения отдельных клеточных фракций или специфических органелл иногда на этом этапе применяют дифференциальное центрифугирование (рис. 1-8).

Существует множество методов, позволяющих выделить один или несколько белков из грубого экстракта или препарата органелл. Обычно экстракт подвергают процедуре, позволяющей разделить белки на **фракции**, пользуясь различиями в размерах или зарядах белковых молекул. Данный процесс называется **фракционированием**. На первых стадиях фракционирования пользуются различной растворимостью белков, зависящей от таких условий, как рН, температура, концентрация соли и др. Растворимость белков обычно снижается при повышении концентрации соли в растворе; данный эффект называют «высаливанием» или осаждением солями. Добавление определенной порции соли может вызвать селективное осаждение не-

которой фракции белков, в то время как другие все еще будут оставаться в растворе. Сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ очень часто используется для высаливания белков. С помощью этой процедуры некоторые белки переводят в осадок (который затем удаляют путем центрифугирования на низкой скорости) и отделяют тем самым эту белковую фракцию от других белков, остающихся в растворе.

Далее раствор белка можно подвергнуть **диализу** — процедуре, при которой белки отделяются от других растворенных веществ благодаря своему большому размеру. Частично очищенный экстракт помещают в мешочек из полупроницаемой мембраны и погружают в большой объем буфера с определенной ионной силой; через мембрану могут проходить соли и компоненты буфера, но не белки. В результате диализа в мешочке остаются крупные белки, а концентрация солей в мешочке сравнивается с концентрацией в растворе за пределами мембраны. Диализ можно использовать, например, для удаления сульфата аммония из препарата белка.

Наиболее мощным методом фракционирования белков является **колоночная хроматография**, основанная на различии размеров, зарядов, аффинности и других свойств белков (рис. 3-16). Колонку заполняют твердым пористым материалом (носитель, или стационарная фаза), сквозь который может проходить буферный раствор (подвижная фаза). Раствор белка наносят в верхнюю часть колонки, и он начинает просачиваться сквозь твердую матрицу как постоянно расширяющаяся полоса внутри подвижной фазы. Отдельные белки движутся сквозь колонку медленнее или быстрее в зависимости от их свойств.

Ионообменная хроматография основана на различии знака и величины заряда белков при данном значении рН. Носитель, которым заполняют колонку, представляет собой синтетический полимер (смола), содержащий связанные заряженные группы. Носители с анионными группами называют **катионообменниками**, а с катионными группами — **анионообменниками**. Сродство каждого белка к заряженным группам носителя зависит от рН (который определяет состояние ионизации молекулы) и концентрации конкурирующих свободных ионов в растворе. Улучшить разделение можно путем постепенного

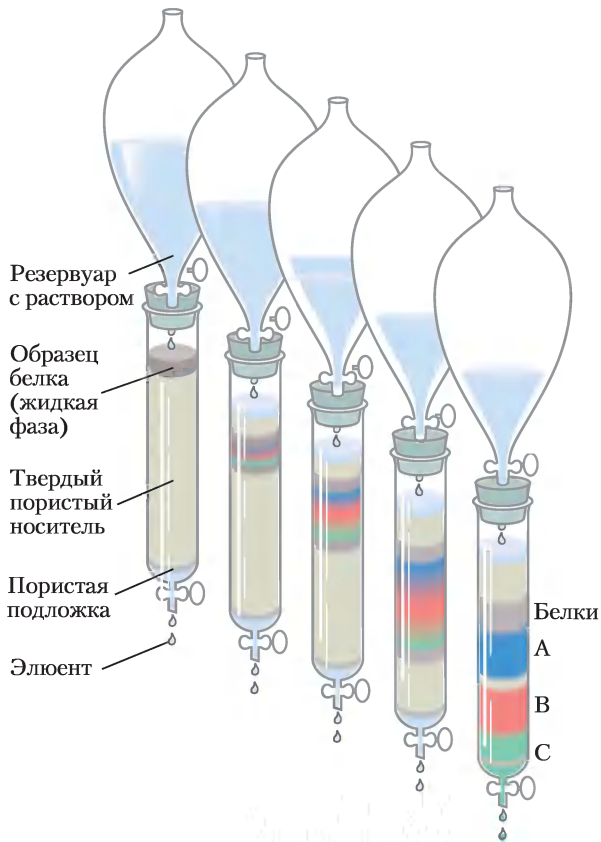


Рис. 3-16. Колоночная хроматография. Стандартная колоночная хроматография подразумевает наличие твердого пористого материала, помещенного в стеклянную или пластиковую колонку. Твердый материал (матрица, или носитель) создает стационарную фазу, сквозь которую протекает жидкость (подвижная фаза). Сверху из резервуара в колонку постоянно поступает раствор, он протекает сквозь колонку и выходит снизу (элюент). Раствор подлежащих разделению белков наносят в верхнюю часть колонки и дают ему войти в твердую фазу. Далее в колонку продолжают добавлять растворитель. Раствор белка образует внутри подвижной фазы полосу, ширина которой сначала равна слою внесенного образца. По мере прохождения через колонку белки начинают удерживаться на носителе за счет разнообразных взаимодействий. В результате общая полоса белка расширяется. Отдельные белки (А, В и С, показанные синим, красным и зеленым цветом) постепенно отделяются друг от друга, и каждый образует отдельную фракцию (полосу) внутри общей полосы белка. Чем больше длина колонки, тем лучше разделение, однако полоса каждого отдельного белка со временем также начинает расплываться за счет диффузии, что ухудшает разрешение. В данном примере белок А хорошо отделился от белков В и С, но из-за диффузии полное разделение В и С в данных условиях не представляется возможным.

изменения рН и(или) концентрации солей в подвижной фазе, т. е. путем создания градиента рН или концентрации соли. При **катионообменной хроматографии (рис. 3-17, а)** стационарная фаза имеет отрицательно заряженные группы. Белок, несущий суммарный положительный заряд, движется в жидкой фазе медленнее, чем белок, несущий отрицательный заряд, поскольку продвижение первого белка тормозится за счет взаимодействия с носителем.

Расширение полосы белка в подвижной фазе объясняется как разделением белков с различными свойствами, так и диффузией. По мере увеличения длины колонки вероятность разделения двух белков с различными зарядами обычно возрастает, однако время разделения увеличивается. В результате разделение полос может даже ухудшиться, поскольку с увеличением длительности процесса преобладающий эффект оказывает диффузия. По мере выхода раствора с колонки фракции элюента собирают в отдельные пробирки. Затем каждую фракцию тестируют на присутствие искомого белка и других белков. Все фракции, в которых содержится искомым белком, можно объединить.

Пример 3-1

РАЗДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ С ПОМОЩЬЮ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Биохимик хочет разделить два пептида с помощью ионообменной хроматографии. При том значении рН, при котором происходит разделение на колонке, пептид А имеет суммарный заряд -3 , поскольку в его последовательности чаще встречаются остатки Glu и Asp, чем Arg, Lys и His. Пептид В имеет суммарный заряд $+1$. Какой пептид будет первым сходить с колонки, заполненной катионообменной смолой? Какой пептид будет первым сходить с колонки, заполненной анионообменной смолой?

Решение. Катионообменная смола имеет на поверхности отрицательно заряженные группы и связывает положительно заряженные молекулы, замедляя их перемещение вдоль колонки. Пептид В, несущий положительный заряд, сильнее связывается с катионообменной смолой, чем пептид А, так что пептид А будет сходить с ко-

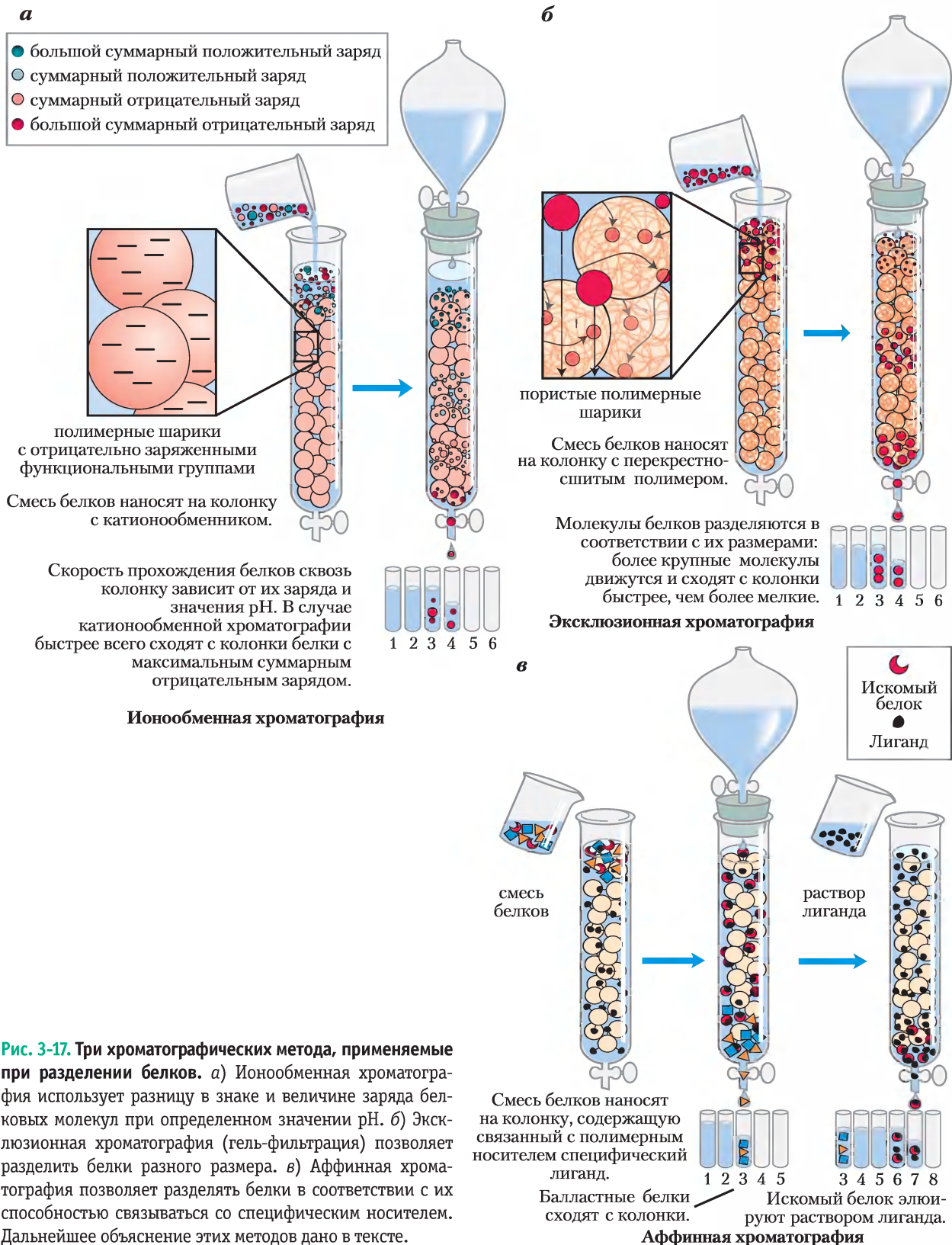


Рис. 3-17. Три хроматографических метода, применяемые при разделении белков. а) Ионообменная хроматография использует разницу в знаке и величине заряда белковых молекул при определенном значении pH. б) Эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация) позволяет разделить белки разного размера. в) Аффинная хроматография позволяет разделять белки в соответствии с их способностью связываться со специфическим носителем. Дальнейшее объяснение этих методов дано в тексте.

лонки первым. В случае анионообменной смолы первым будет выходить пептид В. Пептид А, несущий отрицательный заряд, задерживается за счет взаимодействия с положительно заряженными группами носителя.

На рис. 3-17 представлены два других метода колоночной хроматографии. **Эксклюзионная хроматография** (также называемая ситовой хроматографией или **гель-фильтрацией**; рис. 3-17, б) позволяет разделить белки разного размера. В этом методе более крупные белки сходят с колонки быстрее мелких белков, что на первый взгляд противоречит интуитивным соображениям. Дело в том, что твердая фаза колонки состоит из шариков с порами или полостями определенного размера. Крупные белки не могут проникать в поры и поэтому просто проходят между шариками. Мелкие белки попадают в поры, задерживаются там и в результате движутся сквозь колонку медленнее.

Аффинная хроматография основана на способности белков связываться с носителем (рис. 3-17, в). Шарик в колонке на своей поверхности несет присоединенные ковалентной связью химические группы, называемые лигандами; лиганд — это химическая группа или молекула, связывающаяся с макромолекулой (например, с белком). При нанесении на колонку смеси белков каждый белок, имеющий сродство к этому лиганду, связывается с шариками; в результате его продвижение вдоль колонки замедляется. Например, если биологическая функция белка подразумевает его связывание с АТР, то связывание АТР с шариками позволит создать аффинную матрицу, которую можно использовать для очистки этого белка. При прохождении раствора белка вдоль колонки все АТР-связывающие белки (включая искомым белок) связываются с матрицей. Когда все не связывающиеся с матрицей белки сходят с колонки, связанные с матрицей белки смываются раствором, содержащим либо высокую концентрацию соли, либо свободный лиганд (в данном случае АТР). Соль ослабляет связывание белка с иммобилизованным лигандом, нарушая ионные взаимодействия. Свободный лиганд конкурирует с иммобилизованным лигандом за связывание с белком, что приводит к снятию белка с матрицы. Однако в данном случае сходящий

с колонки белок часто связан с лигандом, применявшимся для элюирования.

Наиболее усовершенствованным хроматографическим методом является **высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ или HPLC, от англ. high-performance liquid chromatography)**. В данном методе для ускорения движения белковых молекул через колонку используют насосы, создающие высокое давление. Кроме того, применяют специально разработанные высококачественные хроматографические материалы, способные выдерживать условия высокого давления. Снижение времени прохождения белка через колонку позволяет ограничить диффузию и тем самым значительно улучшить разрешение.

Метод очистки нового белка каждый раз подбирают, исходя из опыта и здравого смысла. В большинстве случаев для очистки белка приходится последовательно применять несколько различных методов, основанных на разделении белков в соответствии с различными параметрами и свойствами. Например, если определенная стадия очистки позволяет отделить АТР-связывающие белки от белков, которые с АТР не связываются, то на следующей стадии очистки необходимо отделить искомым белок от остальных АТР-связывающих белков на основании различия размеров или зарядов. Выбор часто осуществляется эмпирически; иногда в поисках наиболее эффективного способа приходится опробовать множество разных подходов. Этот поиск иногда удается несколько сократить, если использовать методы очистки, применявшиеся ранее для аналогичных белков. На сегодняшний день опубликованы протоколы выделения тысяч самых разных белков. Здравый смысл подсказывает, что такие недорогие методы, как осаждение солями, следует использовать на начальных этапах очистки, когда общий объем смеси и количество примесей максимальны. Применение хроматографических методов на первых этапах непрактично, поскольку при большом объеме образца для разделения требуется большое количество дорогостоящих хроматографических сред. По мере очистки препарата его объем обычно сокращается (табл. 3-5), что делает возможным применение более сложных (и дорогих) хроматографических методов.

Таблица 3–5 Схема очистки гипотетического фермента

Метод очистки	Объем фракции (мл)	Общее количество белка (мг)	Активность (единицы)	Удельная активность (единицы/мг)
1. Грубый экстракт	1 400	10 000	100 000	10
2. Осаждение сульфатом аммония	280	3 000	96 000	32
3. Ионообменная хроматография	90	400	80 000	200
4. Гель-фильтрация	80	100	60 000	600
5. Аффинная хроматография	6	3	45 000	15 000

Замечание: численные данные отражают состояние образца после проведенной процедуры очистки. Определения активности и удельной активности приведены на с. 140.

Белки можно разделить и охарактеризовать методом электрофореза

Еще один важный метод разделения белков основан на способности заряженных белковых молекул двигаться в электрическом поле — этот процесс называют **электрофорезом**. Электрофорез редко используют для очистки больших количеств белков, поскольку обычно существуют другие, более простые методы, кроме того, этот процесс часто нарушает структуру и биологическую активность белка. Однако электрофорез чрезвычайно широко используется как аналитический метод. Достоинство метода состоит в том, что белки можно не только разделить, но и визуализировать, что позволяет быстро оценить количество белков в смеси или степень чистоты данного белкового препарата. Методом электрофореза можно также определить важнейшие характеристики белка, например изоэлектрическую точку и молекулярную массу.

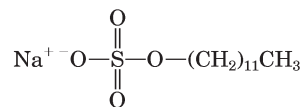
Электрофорез белков обычно проводят в полиакриламидном геле (полимер с перекрестными сшивками) (рис. 3-18). Полиакриламидный гель действует в качестве молекулярного сита, в котором скорость движения белков пропорциональна отношению их заряда и массы. На скорость движения, кроме того, может влиять форма белковой молекулы. Молекулы движутся в электрическом поле, которое создается при наложении потенциала. Отношение скорости движения частицы (V) к электрическому потенциалу (E) называют электрофоретической подвижностью молекулы (μ). Электрофоретическая подвижность, кроме того, равна отношению суммарного заряда молекулы (Z) к

коэффициенту торможения (f), обусловленному с формой молекулы.

$$\mu = \frac{V}{E} = \frac{Z}{f}$$

Таким образом, подвижность белка в геле в процессе электрофореза определяется его размером и формой.

Электрофорез, использующийся для оценки чистоты белка и его молекулярной массы, проводят в присутствии детергента **додецилсульфата натрия** (SDS от англ. *sodium dodecyl sulfate*).



додецилсульфат натрия (SDS)

Додецилсульфат натрия связывается с большинством белков в количестве, пропорциональном молекулярной массе белка, приблизительно одна молекула SDS на каждые два аминокислотных остатка. В результате молекула белка приобретает большой отрицательный заряд, по сравнению с которым собственный заряд белка оказывается несущественным; кроме того, все белки в присутствии SDS характеризуются одинаковым отношением заряда к массе. При связывании молекул SDS белки частично теряют нативную конформацию и приобретают приблизительно одну и ту же форму. Таким образом, разделение белков методом электрофореза в присутствии SDS происходит почти исключительно в соответствии с их молекулярными массами: чем меньше белок, тем быстрее он движется. После проведения электрофореза белки визуализируют с помощью красителя Кумасси синего, который окрашивает

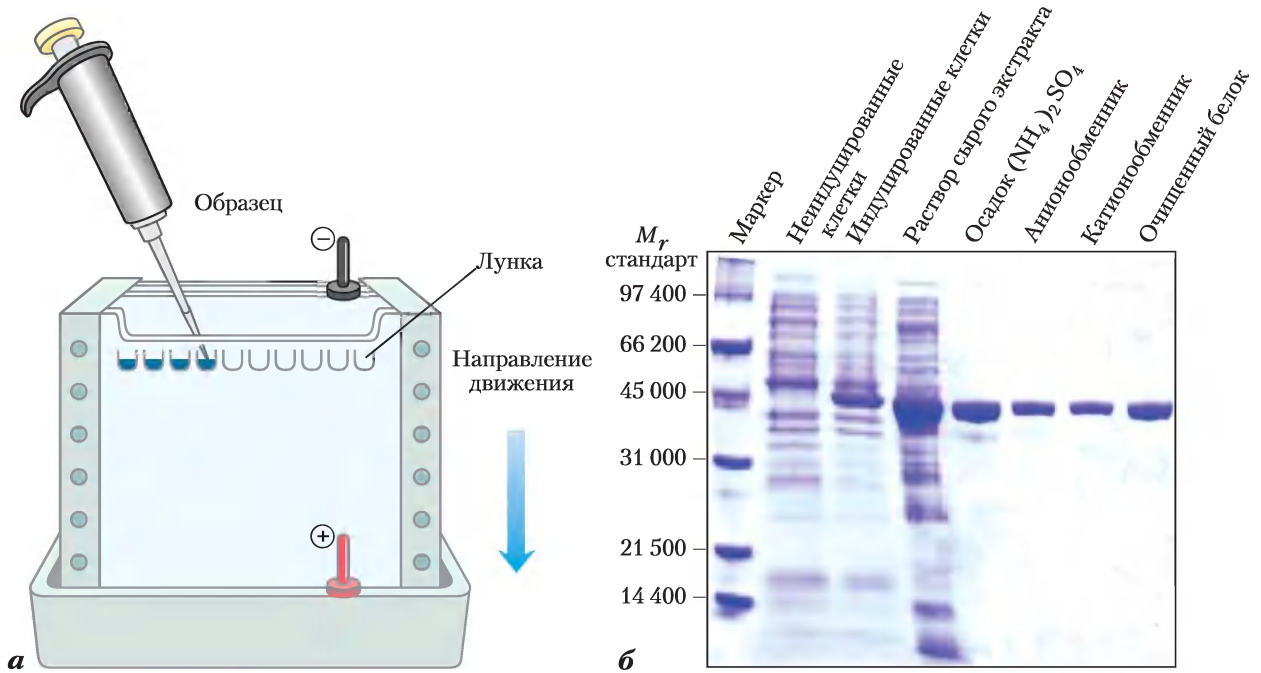



Рис. 3-18. Электрофорез. *а*) В лунки в верхней части полиакриламидного геля вносят различные образцы белков. При подключении электрического тока белки начинают двигаться внутри геля. Гель минимизирует как конвекционные потоки, вызванные небольшими температурными перепадами, так и перемещение белка, за исключением того, что связано с движением в электрическом поле. *б*) После проведения электрофореза белки можно визуализировать, обработав гель раствором красителя Кумасси синего, который связывается только с белками, но не с гелем. Каждая полоса на геле соответствует отдельному белку (или субъединице белка); более мелкие белки мигрируют в геле быстрее, чем более крупные, и поэтому находятся в нижней части геля. Результаты очистки белка RecA из *Escherichia coli* (см. гл. 25). Ген белка RecA был клонирован (гл. 9), так что его экспрессию (синтез белка) можно контролировать. На первой дорожке — набор стандартных белков с известными значениями M_r — маркеры. На двух следующих дорожках представлен набор белков *E. coli* до и после индукции синтеза RecA соответственно. На четвертой дорожке нанесены белки из грубого клеточного экстракта. Далее на дорожках (слева направо) последовательно представлены образцы после каждой стадии очистки. Очищенный белок имеет единственную полипептидную цепь с $M_r \approx 38\ 000$.

белки, но не окрашивает сам гель (рис. 3-18, б). С помощью этого метода удобно следить за ходом очистки белка по количеству белковых полос, остающихся на геле после проведения каждой следующей стадии очистки. Сравнивая расстояния, пройденные в геле исследуемым белком и белками с известной молекулярной массой, можно оценить молекулярную массу исследуемого белка (рис. 3-19). Белки, состоящие из нескольких субъединиц, при электрофорезе в присутствии SDS обычно разделяются на отдельные субъединицы, каждая из которых видна как отдельная полоса.  **SDS гель-электрофорез.**

Для нахождения численного значения изоэлектрической точки белка (pI) пользуются методом **изоэлектрофокусирования** (рис. 3-20). Градиент pH создается смесью низкомолекулярных органических кислот и оснований (амфолитов, с. 123), которые распределяются в геле под действием электрического поля. Если нанести на гель смесь белков, то в электрическом поле каждый из них движется до тех пор, пока не достигнет области pH, совпадающей с его значением pI (табл. 3-6). Таким образом, белки с разными изоэлектрическими точками локализируются в разных участках геля.

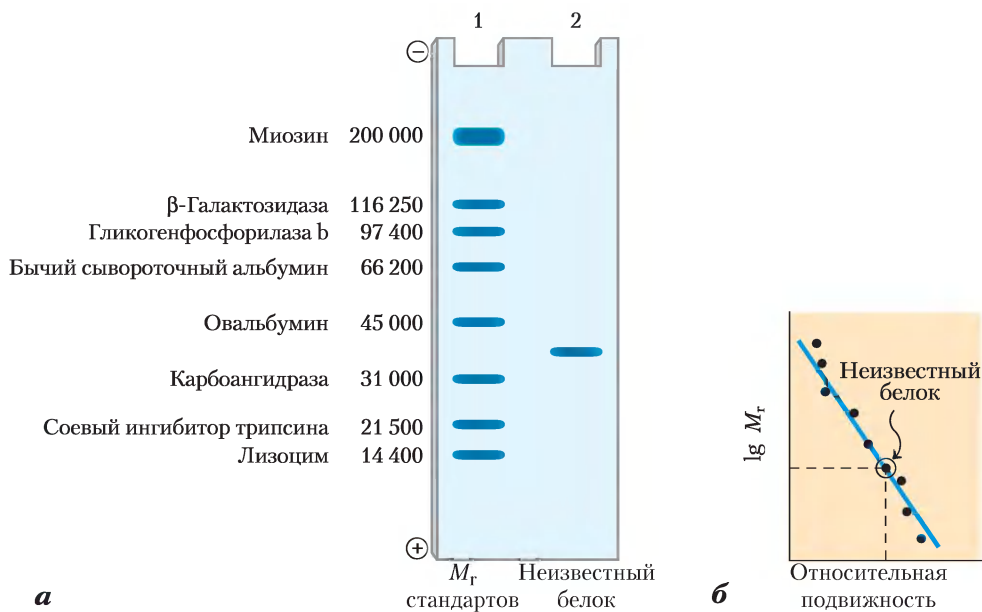


Рис. 3-19. Оценка молекулярной массы белка. На основании подвижности белка в процессе SDS-электрофореза можно определить его молекулярную массу. *а*) Для определения неизвестной молекулярной массы белка (нанесен на дорожку 2) используют набор маркерных белков с известными молекулярными массами (дорожка 1). *б*) По графику зависимости относительной подвижности маркерных белков от логарифма их молекулярных масс можно найти молекулярную массу неизвестного белка.

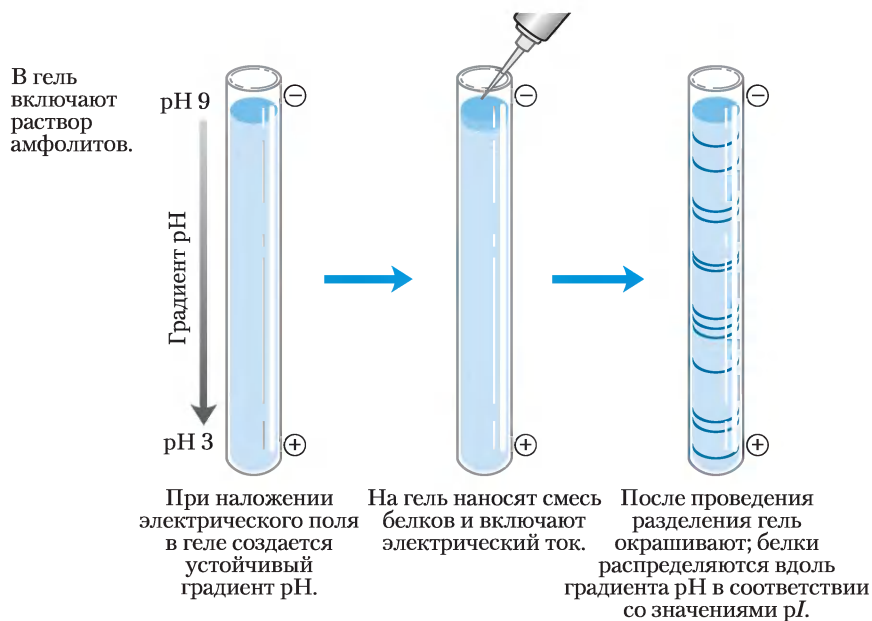


Рис. 3-20. Изоэлектрофокусирование. Данный метод позволяет разделить белки с различающимися значениями изоэлектрических точек. С помощью раствора подходящих амфолитов создают градиент pH в геле. Затем в лунку на геле наносят смесь белков. При подключении электрического поля белки входят в гель и движутся до тех пор, пока не достигнут тех областей, значения pH которых равны значениям изоэлектрических точек белков (поскольку при $pH = pI$ суммарный заряд белка равен нулю).

Таблица 3-6 Изоэлектрические точки некоторых белков

Белок	pI
Пепсин	< 1,0
Яичный альбумин	4,6
Сывороточный альбумин	4,9
Уреаза	5,0
β -Лактоглобулин	5,2
Гемоглобин	6,8
Миоглобин	7,0
Химотрипсиноген	9,5
Цитохром с	10,7
Лизоцим	11,0

Сложные смеси белков можно разделить, если последовательно использовать изоэлектрофокусирование и SDS-электрофорез с помощью так называемого метода **двумерного электрофореза** (рис. 3-21). Этот метод более чувствителен, чем простой электрофорез. Двумерный электрофорез позволяет разделить белки с одинаковой молекулярной массой, но разными значениями pI , а также белки с одинаковым значением pI , но с разными молекулярными массами.

Возможность контролировать содержание белка в неразделенных смесях

В процессе очистки белка необходимо иметь возможность контролировать его наличие и определять его количество в неразделенной смеси белков. Но часто приходится осуществлять очистку белка при полном отсутствии информации о его молекулярной массе, физических свойствах и о его содержании в белковом препарате. Если речь идет о ферментах, то их количество в растворе или экстракте ткани можно измерить или хотя бы оценить на основании их каталитической активности, т. е. по *увеличению* скорости превращения субстрата в присутствии образца фермента. Для этого нужно знать: 1) суммарное уравнение ферментативного процесса; 2) аналитический метод, позволяющий измерять убыль субстрата или прирост продукта реакции; 3) зависимость активности фермента от каких-либо кофакторов (ионов металлов) или коферментов; 4) зависимость ферментативной активности от концентрации субстрата; 5) оптимум pH;

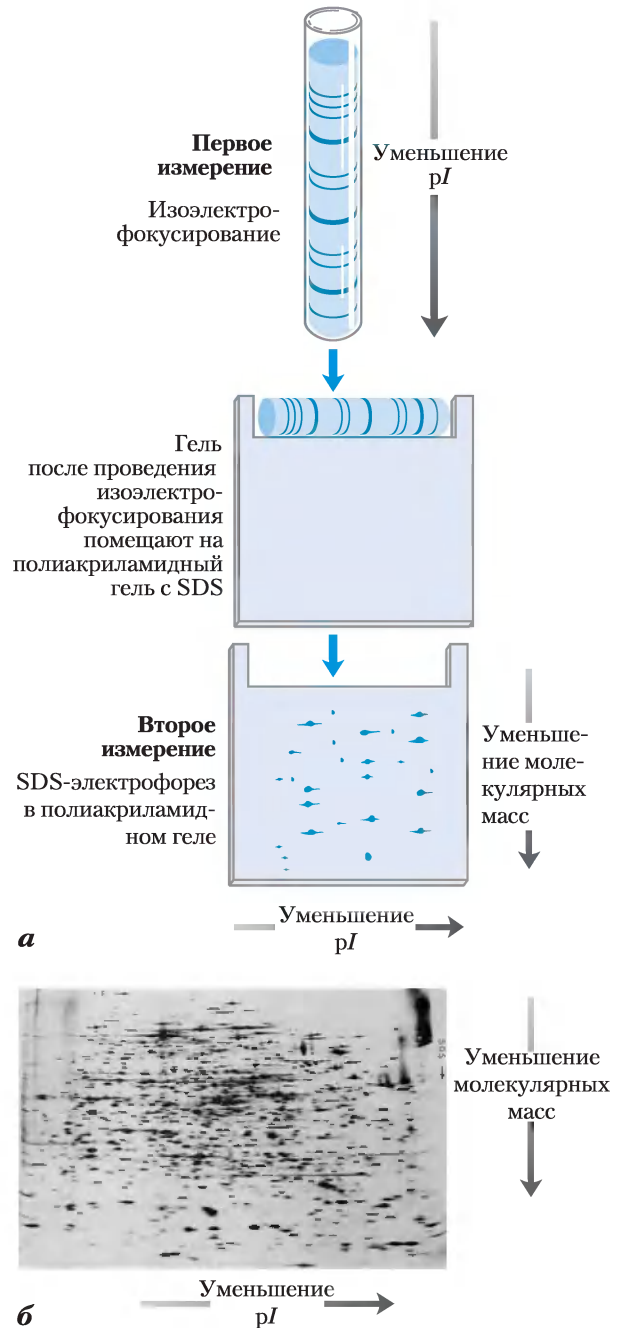


Рис. 3-21. Двумерный электрофорез. а) На первом этапе белки разделяют методом изоэлектрофокусирования в цилиндрическом геле. Затем пластину геля помещают горизонтально на второй гель и подвергают белки разделению с помощью SDS-электрофореза. В горизонтальном направлении белки разделяются в соответствии со значениями pI , а в вертикальном направлении – в соответствии со значениями молекулярных масс. б) Таким способом удалось разделить более 1000 белков из клеток *E. coli*.

б) диапазон температуры, в котором фермент активен и стабилен. Анализ активности ферментов обычно проводят при оптимальных для них значениях pH и при температуре от 25 до 38 °С. Кроме того, обычно берут очень высокие концентрации субстратов, чтобы начальная скорость реакции была пропорциональна концентрации фермента (гл. 6).

Активность ферментов принято измерять в международных ферментативных единицах. В соответствии с международной договоренностью за одну единицу ферментативной активности принимают такое количество фермента, которое вызывает превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при 25 °С при оптимальных условиях проведения реакции (для некоторых ферментов это определение некорректно, и их активность определяют по-другому). Под термином **активность** понимают общее количество единиц активности фермента в образце. **Удельной активностью** называют количество единиц ферментативной активности, приходящихся на 1 мг общего белка (рис. 3-22). Удельная активность является мерой чистоты фермента: она возрастает в процессе очистки, становится максимальной и больше не изменяется, когда фермент очищен окончательно (табл. 3-5, с. 136).

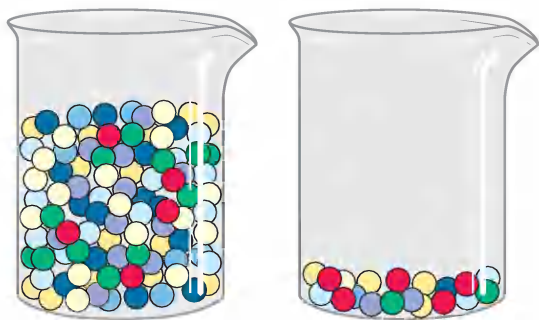


Рис. 3-22. Активность и удельная активность. Разницу между этими двумя понятиями можно объяснить на примере двух стаканов с шариками. В стаканах содержится одинаковое количество красных шариков, но различное количество шариков других цветов. Если под шариками подразумевать белки, то в стаканах содержится одинаковая *активность* белка, представленного красными шариками. Однако *удельная активность* этого белка во втором стакане выше, поскольку в нем красные шарики составляют более значительную долю от общего числа шариков.

После каждой стадии очистки следует определять ферментативную активность образца (в единицах ферментативной активности) и общее количество белка; отношение этих двух значений дает удельную активность образца. Общая активность и общее количество белка обычно снижаются в процессе очистки препарата. Ферментативная активность снижается, поскольку очистка неминуемо сопряжена с некоторой инактивацией фермента, например, из-за неблагоприятных взаимодействий с хроматографическими средами или с другими молекулами. Общее количество белка снижается, поскольку целью очистки как раз и является удаление максимального количества ненужного или неспецифического белка. Стадию очистки можно считать удачной, если после ее проведения потери неспецифического белка значительно выше потерь ферментативной активности; таким образом, удельная активность образца возрастает, несмотря на то что общая активность падает. Данные о стадиях очистки образца и их результатах объединяют в таблицы, аналогичные табл. 3-5. Белок считается чистым, если при проведении дальнейшей очистки не удастся повысить удельную активность, а также если с помощью аналитических методов (например, электрофореза) детектируется единственная белковая полоса.

Для белков, не обладающих ферментативной активностью, применяют другие методы очистки и контроля. Транспортные белки можно определять по связыванию с транспортируемыми ими молекулами, а гормоны и токсины — по оказываемому ими биологическому действию. Например, гормоны роста должны стимулировать рост определенных клеточных культур. Некоторые структурные белки составляют настолько значительную фракцию от общего белка клетки или ткани, что их удается довольно легко выделить и очистить без проведения функционального анализа. В этом смысле методов существует столько же, сколько и самих белков.

Краткое содержание раздела 3.3 КАК РАБОТАТЬ С БЕЛКАМИ

■ Методы очистки и разделения белков основаны на различии их свойств. Белки можно селективно осадить, добавляя в раствор определенные соли. Существует несколько хроматографиче-

ских методов разделения, основанных на разнице молекулярных масс, сродства, заряда и других свойств белков. Из хроматографических методов чаще всего применяют ионообменную, эксклюзионную, аффинную и высокоэффективную жидкостную хроматографию.

- Электрофоретические методы позволяют разделить белки с разной молекулярной массой или зарядом. Методы SDS-электрофореза и изоэлектрофокусирования можно использовать как по отдельности, так и в сочетании, что позволяет получить лучшее разрешение.
- При осуществлении любой процедуры очистки белка необходим метод наблюдения за искомым белком на фоне всех других белков в смеси. Чистоту белка контролируют по удельной активности.

3.4. Структура белка: первичная структура

Очистка белка — это лишь начало детального биохимического анализа его структуры и функций. Почему один белок является ферментом, другой — гормоном, третий — структурным белком, а

еще один — антителом? Чем они принципиально различаются с химической точки зрения? Наиболее очевидные различия проявляются в структуре белков на каждом уровне их организации.

Задача описания и понимания структуры таких крупных макромолекул, как белки, решается на разных уровнях сложности. Обычно для белков выделяют четыре уровня структурной организации (рис. 3-23). С помощью многочисленных ковалентных связей (главным образом пептидные связи и дисульфидные мостики), аминокислотные остатки соединяются в полипептидную цепь; это и есть **первичная структура** белка. Наиболее важным элементом первичной структуры является *последовательность* аминокислотных остатков. **Вторичной структурой** называют некоторые наиболее часто встречающиеся способы укладки аминокислотной цепи, формирующие характерные структурные элементы. **Третичная структура** описывает все аспекты пространственной организации белка. Если белок состоит из двух или нескольких полипептидных цепей, их пространственное взаиморасположение описывается **четвертичной структурой**. При знакомстве с белками мы рассмотрим даже такие сложные белковые агрегаты, которые состоят из десятков и даже тысяч субъединиц. Первичная структура белка является предметом рассмотре-

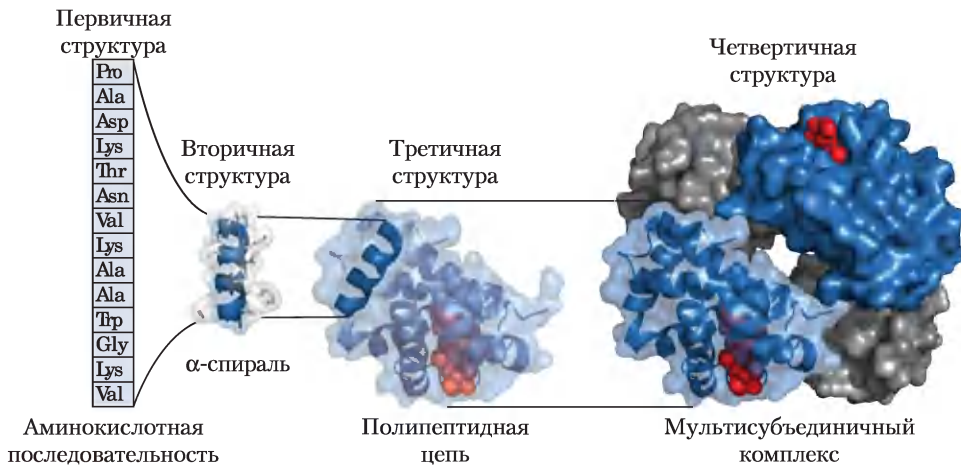


Рис. 3-23. Уровни организации белковых молекул. Первичная структура белка представляет собой последовательность аминокислот, связанных между собой пептидными связями и дисульфидными мостиками. Образующийся полипептид может сворачиваться в определенную вторичную структуру, например в α-спираль. Спираль является частью третичной структуры молекулы, которая, в свою очередь, может быть лишь одной из нескольких субъединиц мультисубъединичного белка, вместе формирующих его четвертичную структуру (на рисунке изображена структура гемоглобина).

ния в настоящей главе; более высокие уровни организации белков обсуждаются в гл. 4.

Особенно информативными могут быть различия в первичной структуре. Каждый белок характеризуется определенным числом и последовательностью аминокислотных остатков. Как мы увидим в гл. 4, именно первичная структура белка определяет его трехмерную структуру, которая в свою очередь отвечает за функции белка. В фокусе нашего внимания в данной главе будет первичная структура белка. Прежде всего, мы остановимся на эмпирическом правиле, что аминокислотная последовательность белка и его функции тесно связаны между собой. Затем мы рассмотрим способы определения аминокислотной последовательности белка и в завершение поговорим о том, как много информации можно почерпнуть из первичной структуры белка.

Функция белка зависит от аминокислотной последовательности

Бактерия *Escherichia coli* синтезирует свыше 3000 различных белков, а у человека около 25 000 генов, кодирующих еще большее количество белков (генетические аспекты обсуждаются в части III настоящей книги). В обоих случаях каждый тип белка характеризуется уникальной трехмерной структурой, необходимой для выполнения определенной функции. Каждый белок, кроме того, имеет уникальную аминокислотную последовательность. Интуиция подсказывает, что именно аминокислотная последовательность должна определять трехмерную структуру белка и, в конечном итоге, его функции. Но так ли это на самом деле? Беглый обзор многообразия первичных структур белков дает ряд эмпирических доказательств, позволяющих утверждать наличие тесной связи между аминокислотной последовательностью и биологической функцией.

Прежде всего, как мы отмечали выше, белки с различными функциями всегда различаются по аминокислотной последовательности. Кроме того, тысячи различных генетических заболеваний человека сопровождаются образованием аномальных белков. Дефекты могут быть различными: от замены одной-единственной аминокислоты (как при серповидноклеточной анемии, см. гл. 5) до делеции большого участка полипептидной цепи (как в большинстве случаев мышечной

дистрофии Дюшенна, при которой делеция большого участка гена, кодирующего белок дистрофин, приводит к синтезу короткого неактивного белка). Теперь мы знаем, что если изменена первичная последовательность, то и функция белка может измениться. Наконец, при сравнении сходных по функциям белков у организмов, относящихся к разным видам, часто выясняется, что эти белки имеют много общего в аминокислотных последовательностях. Например, белок убиквитин, состоящий из 76 аминокислотных остатков, участвует в регуляции деградации других белков. Было показано, что его последовательность полностью идентична у таких несхожих видов, как фруктовая мушка и человек.

Является ли аминокислотная последовательность определенного белка абсолютно инвариантной? Ответ такой: нет, возможны некоторые отклонения. По оценкам, 20–30% белков человека **полиморфны**, т. е. в популяции людей эти белки имеют несколько различающиеся аминокислотные последовательности. Многие из этих вариаций последовательности практически не оказывают влияния на функционирование белка. Более того, белки со схожими функциями из отдаленно родственных видов могут сильно различаться по размеру и аминокислотной последовательности.

Изменения в некоторых участках аминокислотной последовательности могут не повлиять на функции белка, однако в большинстве белков существуют участки последовательности, особо важные для их активности, и эти участки консервативны. Доля последовательности, наиболее важная для функционирования белка, варьирует в разных белках, что усложняет задачу сопоставления первичной и третичной структур, а также нахождения взаимосвязей между структурой и функциями. Прежде чем подробнее остановиться на этой проблеме, мы поговорим о том, как определяют аминокислотную последовательность белков.

Уже расшифрованы аминокислотные последовательности миллионов белков

Два больших открытия, сделанные в 1953 г., сыграли важнейшую роль в истории биохимии. В 1953 г. Джеймс Д. Уотсон и Фрэнсис Крик создали модель двойной спирали ДНК и предсказали структурный механизм ее репликации (гл. 8). Их предположение раскрыло молекулярные

основы самой идеи гена. Тогда же Фредерик Сенгер определил аминокислотную последовательность гормона инсулина (рис. 3-24),

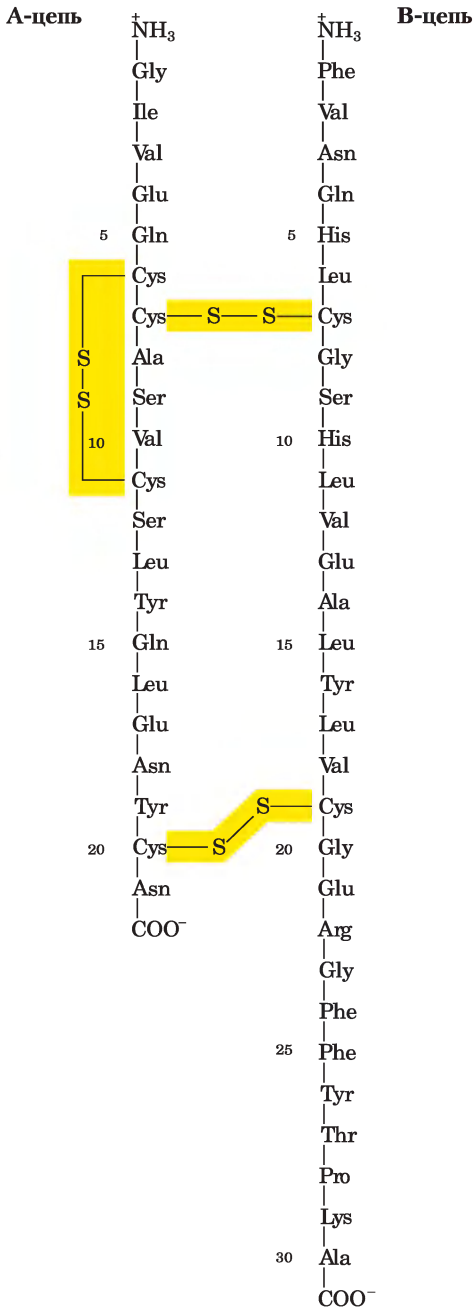


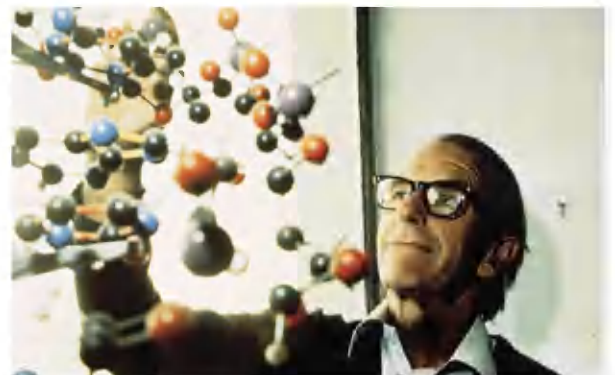
Рис. 3-24. Аминокислотная последовательность инсулина быка. Две полипептидные цепи белка соединены между собой дисульфидными мостиками. Инсулины человека, свиньи, собаки, кролика и кита имеют одинаковые А-цепи, а инсулины коровы, свиньи, собаки, козы и лошади имеют идентичные В-цепи.

удивив многих ученых, считавших расшифровку аминокислотной последовательности полипептидной цепи безнадежно трудным делом. Скоро стало понятно, что нуклеотидная последовательность ДНК и аминокислотная последовательность белка каким-то образом связаны между собой. Всего через 10 лет после этих открытий было установлено, что именно ДНК определяет аминокислотную последовательность белка (гл. 27). Сегодня огромное число белковых последовательностей можно определить на основании последовательностей ДНК, собранных в постоянно растущих банках данных. Однако в современной химии белка часто пользуются традиционным методом секвенирования белков, поскольку так иногда удается выявить детали, которые нельзя установить на основании последовательности гена, такие как модификации, происходящие после завершения синтеза белка.

Химический метод секвенирования белка сегодня дополняет все удлиняющийся список новых методов, обеспечивающих многочисленные пути получения такого рода данных, которые играют важнейшую роль во всех биохимических исследованиях.

Короткие полипептиды секвенируют с помощью автоматических секвенаторов

Для анализа первичной структуры белка применяют различные методы. Разработаны методики, позволяющие пометить и идентифицировать N-концевой аминокислотный остаток (рис. 3-25, а). Сенгер для этой цели предложил использовать 1-фтор-2,4-динитробензол. Для этой же цели



Фредерик Сенгер

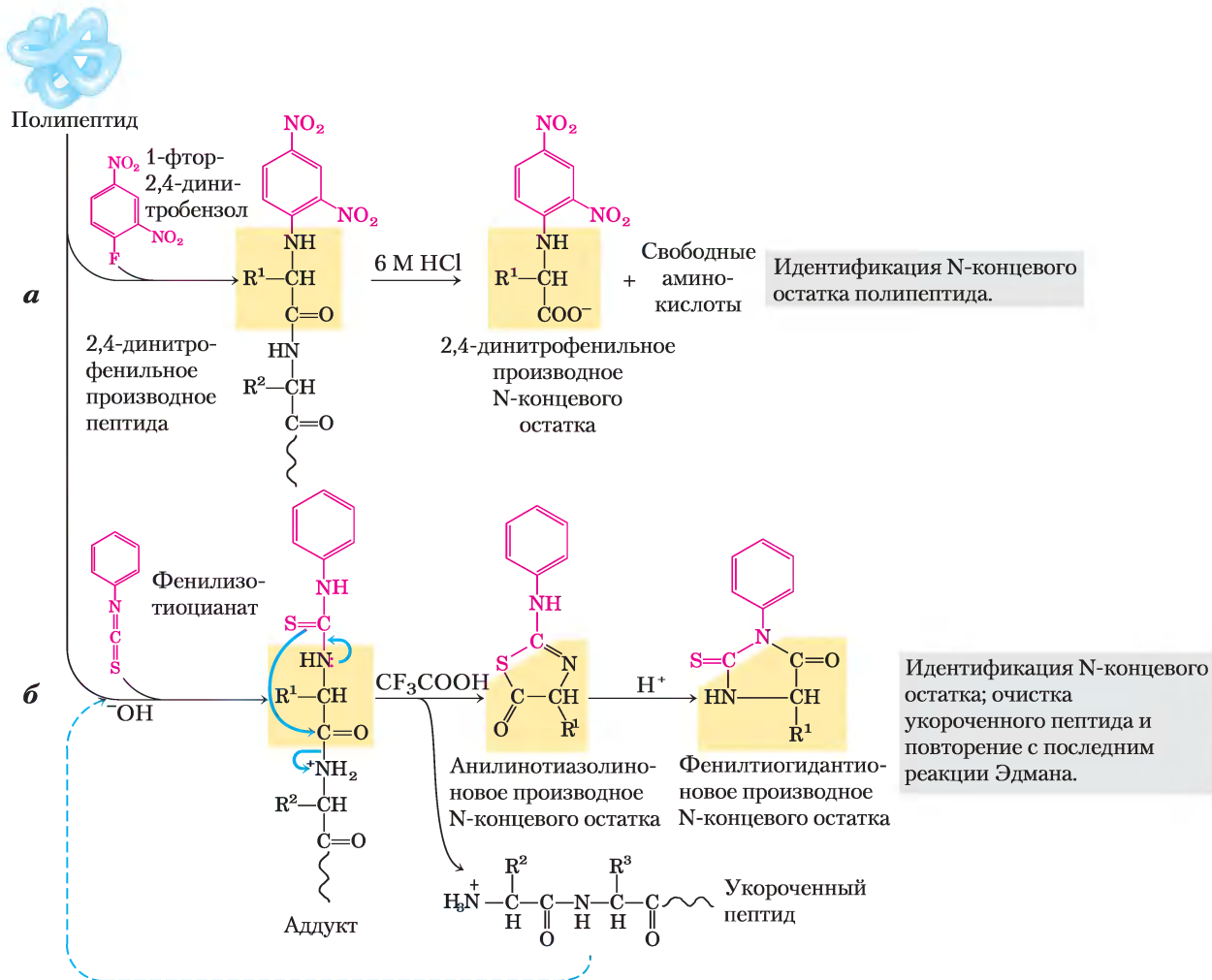
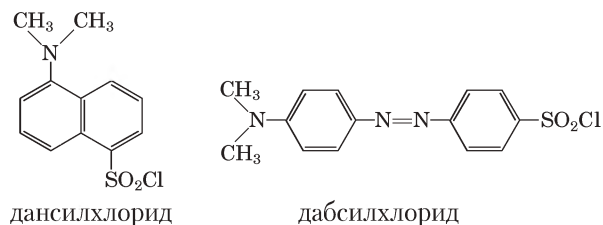


Рис. 3-25. Стадии секвенирования полипептидной цепи. а) Первой стадией секвенирования может быть определение N-концевого аминокислотного остатка. Здесь показана схема определения N-концевого остатка по методу Сенгера. б) Метод Эдмана позволяет определить полную аминокислотную последовательность. В случае коротких пептидов этот метод позволяет определить полную последовательность, и тогда стадию (а) часто пропускают. Стадия (а) полезна в случае больших белков, которые перед секвенированием предварительно разделяют на более мелкие фрагменты (рис. 3-27).

годится дансилхлорид и дабсилхлорид, производные которых легче детектировать, чем динитрофенильные производные. После связывания одного из этих реагентов с N-концевым остатком осуществляют гидролиз полипептидной цепи (6 M HCl) до отдельных аминокислот и определяют меченый остаток. Поскольку в результате данной процедуры полипептид разрушается, эту методику нельзя использовать для определения других остатков, кроме концевых. Однако таким образом можно определить число полипептидных цепей

в белке, если все они имеют различные N-концы. Например, если подвергнуть такой процедуре инсулин, то можно определить два N-концевых остатка — Phe и Gly (рис. 3-24).



Чтобы секвенировать (от англ. *sequence* — последовательность) весь белок, обычно применяют метод, предложенный Пером Эдманом. В **методе деградации по Эдману** удается отделить от полипептидной цепи только N-концевой остаток, не затрагивая все остальные (рис. 3-25, б). Для этого в слабощелочных условиях пептид обрабатывают фенилизотиоцианатом, который присоединяется к N-концевой аминокислоте. Затем образовавшийся аддукт расщепляют с помощью безводной трифторуксусной кислоты, анилинотиазолиноновые производные экстрагируют органическим растворителем, водный раствор подкисляют и получают более устойчивое фенилтиогидантионое производное, которое идентифицируют. Последовательное проведение реакций сначала в щелочных, а затем в кислых условиях позволяет контролировать ход всего процесса. Все реакции, затрагивающие N-концевой аминокислотный остаток, никак не влияют на остальную аминокислотную последовательность. После удаления и идентификации концевого остатка можно пометить *новый* N-концевой остаток, удалить и вновь идентифицировать с помощью той же последовательности реакций. Эту процедуру повторяют до тех пор, пока не определят все аминокислотные остатки пептидной цепи. Определение аминокислотной последовательности по методу Эдмана осуществляют с помощью прибора **секвенатора**, в котором стадии смешивания реагентов, разделения продуктов, идентификации и записи результатов полностью автоматизированы. Данный метод необычайно чувствителен. Иногда с его помощью удается определить аминокислотную последовательность белка, имея в руках всего несколько микрограммов образца.

Длина полипептидной цепи, которую можно секвенировать по методу Эдмана, зависит от эффективности отдельных химических стадий. Представьте себе белок, на N-конце которого расположена последовательность Gly-Pro-Lys и т. д. Если глицин был удален с эффективностью 97%, это означает, что 3% полипептидных молекул в растворе по-прежнему имеют на N-конце остаток глицина. Во втором цикле эффективность удаления пролина составляет 94% (97% остатков Pro отщепляются от 97% молекул,

заканчивающихся на Pro), а глицин составляет 2,9% (97% остатков Gly отщепляются от 3% молекул, заканчивающихся на Gly), а 3% молекул сохраняют на N-конце глицин (0,1%) или пролин (2,9%). И так в каждом цикле те пептиды, которые не отщепились на предыдущей стадии, будут вносить все более и более возрастающую погрешность; в конечном итоге станет невозможно определить, какая же аминокислота находится в настоящий момент на конце цепи. В современных секвенаторах достигается эффективность, превышающая 99% за цикл, так что с их помощью можно определить последовательность из 50 и более остатков. Первичную структуру инсулина, над которой Сенгер с сотрудниками трудились более 10 лет, сегодня можно определить за 1–2 дня прямым секвенированием в белковом секвенаторе. (Как мы будем обсуждать в гл. 8, секвенирование ДНК даже более эффективно.)

Крупные белки перед секвенированием необходимо разрезать на фрагменты

По мере увеличения длины полипептида ошибка определения аминокислотной последовательности обычно возрастает. Для определения последовательностей больших полипептидов и белков их необходимо разрезать на более мелкие фрагменты, а затем каждый секвенировать отдельно. Такая методика состоит из нескольких стадий. Сначала белок расщепляют на специфические фрагменты с помощью химических или ферментативных методов. Если в белке присутствуют дисульфидные связи, их следует разрушить. Каждый фрагмент выделяют из смеси и секвенируют по методу Эдмана. В заключение определяют порядок расположения фрагментов в исходной цепи и локализацию дисульфидных связей, если они есть.

Разрыв дисульфидных связей. Наличие дисульфидных связей мешает определению аминокислотной последовательности. Остаток цистеина (рис. 3-7), отщепленный от полипептидной цепи в реакции Эдмана, может остаться связанным с другой полипептидной цепью дисульфидным мостиком. Кроме того, дисульфидные мостики мешают ферментативному и химическому расщеплению полипептидной цепи на фрагменты.

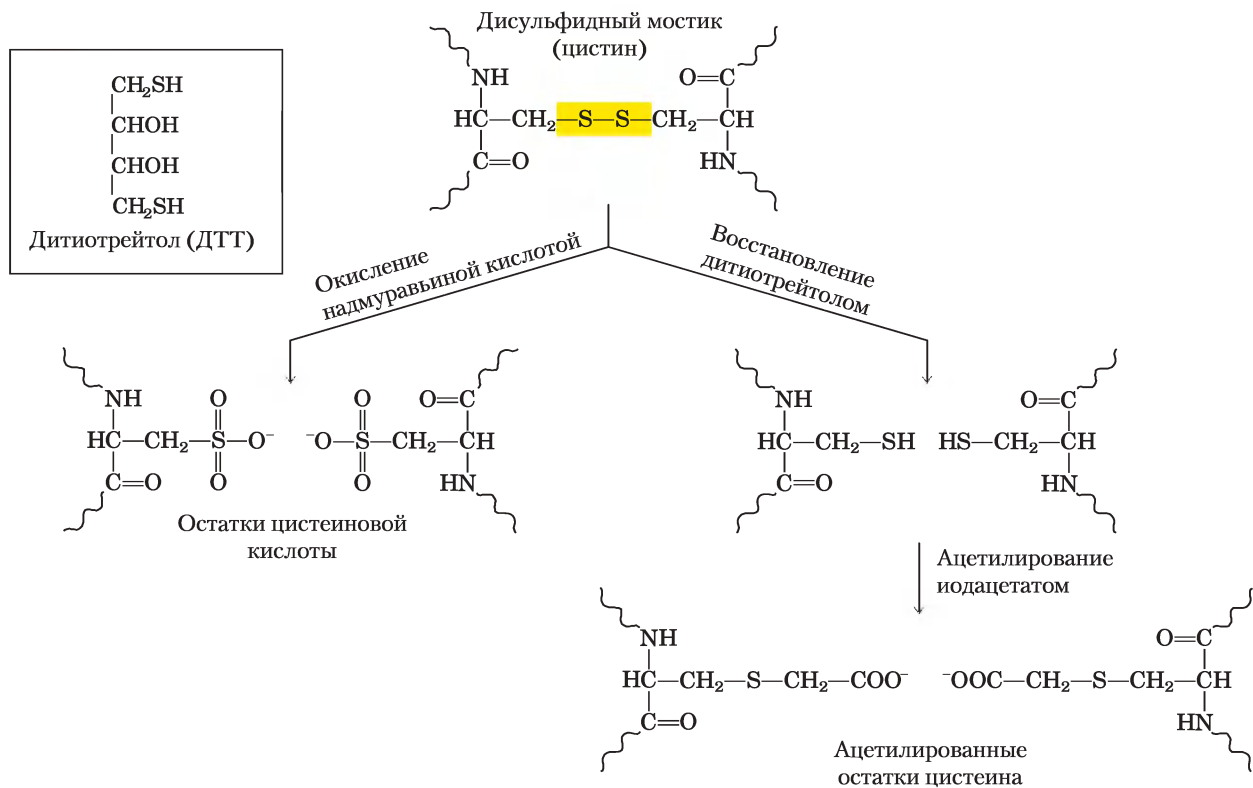


Рис. 3-26. Расщепление дисульфидных мостиков в белках двумя известными методами.

В результате окисления остатков цистеина надмуравьиной кислотой образуются остатки цистеиновой кислоты. После восстановления дитиотрейтолом или β-меркаптоэтанолом с образованием двух остатков цистеина необходимо провести дальнейшую модификацию реакционноспособных –SH групп, чтобы предотвратить появление нового дисульфидного мостика. Для этой цели используют ацелирование иодацетатом.

На **рис. 3-26** схематично изображены два способа необратимого расщепления дисульфидных связей.

Расщепление полипептидной цепи. Существует несколько методов разделения полипептидной цепи на фрагменты. Гидролиз пептидных связей катализируют ферменты **протеазы**. Некоторые протеазы специфически расщепляют только те пептидные связи, которые связывают определенные аминокислотные остатки (табл. 3-7). С помощью таких протеаз можно воспроизводимо получать предсказуемые фрагменты. Некоторые химические реагенты также способны расщеплять пептидную связь между определенными аминокислотами.

Пищеварительный фермент трипсин, относящийся к классу протеаз, катализирует гидролиз только

тех пептидных связей, карбонильная группа которых принадлежит остатку лизина или аргинина, вне зависимости от длины полипептидной цепи. Таким образом, зная общее число остатков Lys и Arg в полипептидной цепи, определенное по результатам полного гидролиза образца (**рис. 3-27**), можно предсказать число фрагментов, на которые расщепится полипептидная цепь при обработке трипсином. Полипептид, имеющий в последовательности пять остатков Lys и (или) Arg, в результате действия трипсина должен расщепиться на шесть фрагментов. Каждый из этих фрагментов, за исключением одного, будет иметь на С-конце остаток Lys или Arg. Фрагменты, полученные в результате расщепления трипсином, другим ферментом или химическим реагентом, далее подвергают очистке хроматографическим или электрофоретическим методом.

Реагент (из биологического источника)*	Участок расщепления**
Трипсин (поджелудочная быка)	Lys, Arg (C)
Протеаза из подчелюстной железы (мышь)	Arg (C)
Химотрипсин (поджелудочная быка)	Phe, Trp, Tyr (C)
Протеаза V8 (бактерия <i>Staphylococcus aureus</i>)	Asp, Glu (C)
Asp-N-протеаза (бактерия <i>Pseudomonas fragi</i>)	Asp, Glu (N)
Пепсин (желудок свиньи)	Leu, Phe, Trp, Tyr (N)
Эндопротеиназа Lys C (бактерия <i>Lysobacter enzymogenes</i>)	Lys (C)
Бромциан	Met (C)

* Все реагенты, за исключением бромциана, являются протеазами; все доступны из коммерческих источников.

** Указанные аминокислотные остатки являются участками узнавания фермента или реагента, которые расщепляют пептидную связь на C- или N-стороне указанного остатка.

Секвенирование пептидов. Каждый фрагмент, полученный в результате расщепления трипсином, секвенируют отдельно по методу Эдмана.

Определение порядка расположения фрагментов в исходном полипептиде. На данном этапе необходимо определить порядок расположения «трипсиновых фрагментов». Для этого образец исходного полипептида подвергают расщеплению *еще одним* ферментом или реагентом, который расщепляет пептидные связи между другими аминокислотными остатками, чем трипсин. Например, можно использовать бромциан, расщепляющий только те пептидные связи, карбонильная группа которых принадлежит остатку метионина. Полученные в результате расщепления фрагменты вновь очищают и секвенируют.

Затем необходимо исследовать аминокислотные последовательности всех имеющихся фрагментов с целью найти такие фрагменты, полученные в результате второго расщепления, которые перекрывали бы разрывы между фрагментами, полученными в первом эксперименте (рис. 3-27). Аминокислотная последовательность этих перекрывающихся пептидных участков позволяет установить порядок фрагментов, полученных в первом расщеплении. Если перед проведением первого расщепления была определена аминокислота, находящаяся на N-конце

полипептида, то с помощью этой информации можно найти фрагмент, прилегающий к N-концу. Кроме того, сравнивая два набора фрагментов, можно найти возможные ошибки в определении аминокислотной последовательности. Иногда второго расщепления полипептида на фрагменты оказывается недостаточно, чтобы найти перекрывающиеся последовательности некоторых фрагментов. В этом случае расщепление проводят третий, а то и четвертый раз, что позволяет в итоге получить полный набор перекрывающихся последовательностей исходной цепи.

Локализация дисульфидных связей. Расположение дисульфидных связей в исходной молекуле определяют после завершения секвенирования последовательности. Для этого исходный полипептид вновь подвергают расщеплению, например трипсином, на этот раз без предварительного разрушения дисульфидных связей. Образующиеся фрагменты разделяют методом электрофореза и сравнивают с набором фрагментов, полученных при первом расщеплении трипсином. Если между двумя фрагментами существует дисульфидная связь, то эти фрагменты отсутствуют в новом наборе фрагментов, зато там появляется более тяжелый фрагмент. Два отсутствующих пептида соответствуют участкам исходной полипептидной цепи, между которыми существует дисульфидная связь.

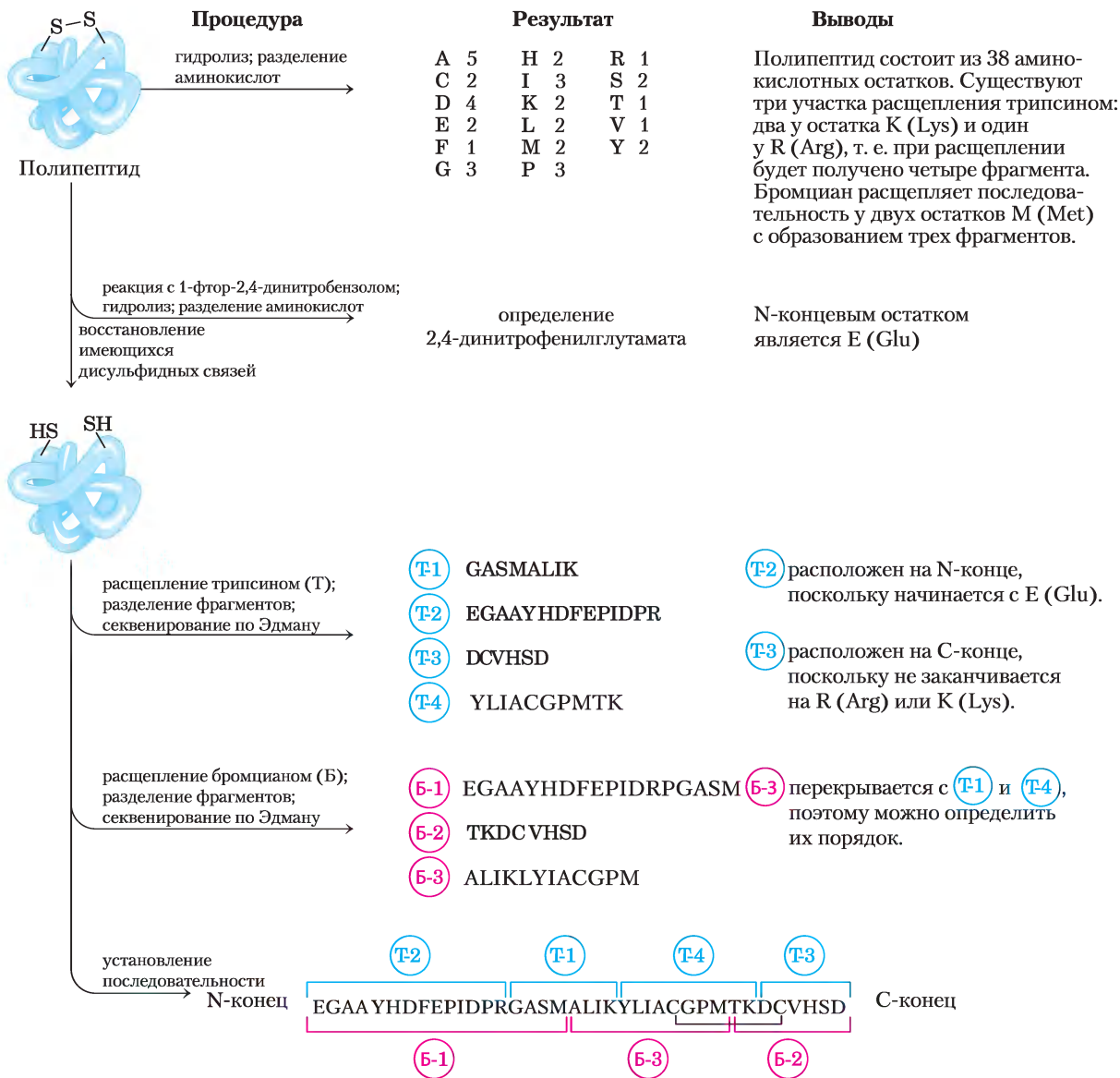


Рис. 3-27. Расщепление и секвенирование пептидов и определение порядка расположения пептидных фрагментов. В первую очередь определяют аминокислотный состав и N-концевую аминокислоту в исходном пептиде. Затем разрушают все имеющиеся в молекуле дисульфидные связи, мешающие секвенированию. В данном полипептиде есть только два остатка цистеина (С) и, соответственно, только одно возможное место локализации дисульфидной связи. В полипептидах с тремя и большим числом остатков цистеина расположение дисульфидных мостиков определяют так, как это описано в тексте. Расшифровку однобуквенных и трехбуквенных обозначений аминокислот см. в табл. 3-1.

Аминокислотную последовательность можно вывести на основании других данных

Описанный выше метод не единственный для установления аминокислотной последовательности. Новые масс-спектрометрические методы

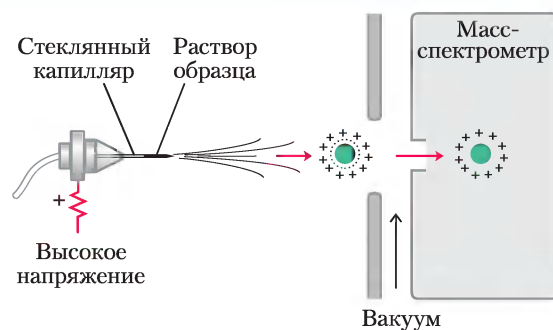
позволяют определять последовательности коротких пептидов (20–30 аминокислотных остатков) всего за несколько минут (доп. 3-2). Кроме того, с развитием быстрых методов секвенирования ДНК (гл. 8), установлением генетического

Дополнение 3–2 ПРАКТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ Масс-спектрометрические методы при изучении белков

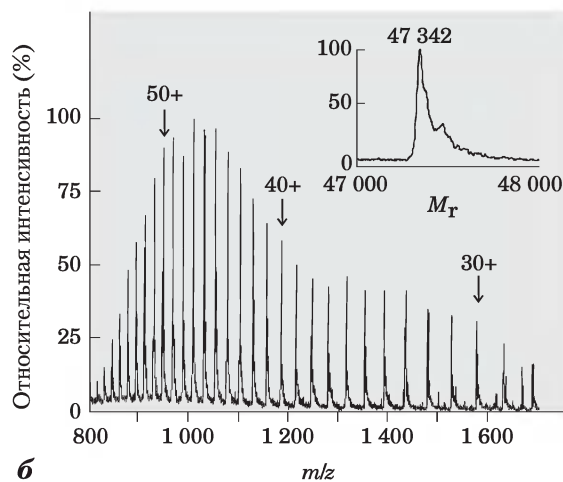
Масс-спектрометр широко используют при химических исследованиях. Сначала анализируемые молекулы (**аналиты**) в вакууме превращают в ионы. Затем эти заряженные частицы оказываются в электрическом и(или) магнитном поле, их передвижение зависит от отношения массы к заряду (m/z). Эта измеряемая величина может быть использована для определения молекулярной массы (M) аналита с высокой точностью.

Масс-спектрометрия используется в качестве метода анализа уже долгие годы, но до недавнего времени не было возможности использовать этот метод для изучения макромолекул, таких как белки и нуклеиновые кислоты. Дело в том, что измерение отношения m/z осуществляется в газовой фазе, а нагревание или другая процедура, необходимая для перевода вещества в газообразное состояние, обычно влечет за собой его разрушение. В 1988 г. были предложены два подхода, позволившие решить эту проблему. В одном методе белок помещают в светопоглощающую матрицу. Под действием пульсирующего лазерного излучения белки в матрице ионизируются и выходят из матрицы в вакуумную камеру. Этот метод, известный как **лазерная десорбционно-ионизационная масс-спектрометрия (MALDI)**, успешно используется для определения молекулярных масс широкого круга макромолекул. Во втором методе макромолекулы переходят в газовую фазу прямо из раствора. Раствор аналита пропускают через распылительную головку, находящуюся в сильном электрическом поле, в результате чего раствор превращается в мельчайшие заряженные капельки. Растворитель мгновенно испаряется, а заряженные макромолекулы в неповрежденном виде оказываются в газовой фазе. Данный метод носит название **электроспрея (ESI-масс-спектрометрии)**. Протоны, присоединяющиеся к макромолекулам в процессе прохождения через распылительное устройство, сообщают им дополнительный заряд. Значение параметра m/z определяют в вакуумной камере.

Масс-спектрометрия позволяет получить большое количество информации, необходимой для исследований в области протеомики, энзимологии и химии белка в целом. Для проведения экспериментов требуются минимальные количества образцов: достаточное количество белка для анализа можно получить, например, методом двумерного электрофореза. Точное опреде-



а



б

Рис. 1. Метод электроспрея для определения молекулярной массы белка. а) Раствор белка в виде мельчайших капелек, несущих высокий заряд, распыляют, пропуская через распыляющую головку, помещенную в сильное электрическое поле. Растворитель испаряется, а ионы аналита (в данном случае с присоединенными протонами) подаются в масс-спектрометр для определения отношения m/z . б) Получают спектр — набор пиков; каждый пик (справа налево) отличается от предыдущего тем, что масса частицы и ее заряд увеличиваются на 1. На вставке показан результат компьютерной обработки данного спектра.

ление молекулярной массы белка — это один из ключевых моментов при его идентификации. Если масса белка известна, то метод масс-спектрометрии позволяет детектировать все изменения, происходящие при связывании кофакторов, ионов металла, при ковалентных модификациях белка и т. д.

На рис. 1 приведен пример определения молекулярной массы белка с помощью метода электроспрея.

При переходе в газовую фазу белок приобретает какое-то количество протонов (т. е. положительных зарядов) от молекул растворителя. В результате образуется спектр частиц с различным отношением массы к заряду. Каждый регистрируемый пик соответствует отдельному типу частиц, отличающемуся от соседнего на единицу заряда и единицу массы (на 1 протон). Молекулярную массу белка можно рассчитать по любым двум соседним пикам. Для одного пика:

$$(m/z)_2 = \frac{M + n_2 X}{n_2}$$

где M — молекулярная масса белка, n_2 — число зарядов, X — молекулярная масса добавленной группы (в данном случае протона). Аналогично, для соседнего пика:

$$(m/z)_1 = \frac{M + (n_2 + 1)X}{n_2 + 1}$$

Теперь у нас есть два неизвестных (M и n_2) и два уравнения, так что можем их решить сначала относительно n_2 , а затем относительно M :

$$n_2 = \frac{(m/z)_2 - X}{(m/z)_2 - (m/z)_1}$$

$$M = n_2[(m/z)_2 - X]$$

Такой способ вычислений на основании значений m/z для любых двух пиков из спектра (рис. 1, б) обычно позволяет найти массу белка с ошибкой $\leq 0,01\%$ (в данном случае анализировали белок аэролизин k с $M = 47\,342$). Использование нескольких серий пиков, повторные вычисления и усреднение результатов могут еще более повысить точность определения молекулярной массы M . Компьютерные программы позволяют получить точный результат по значению m/z для одного пика (рис. 1, б, вставка).

Масс-спектрометрия является бесценным инструментом, с помощью которого можно быстро определить короткую аминокислотную последовательность неизвестного белка. Данный метод называется **тандемной масс-спектрометрией**. Сначала раствор исследуемого белка обрабатывают протеазой или химическим реагентом, чтобы получить смесь более коротких пептидов. Затем эту смесь подают в устройство, представляющее собой два последовательно расположенных масс-спектрометра

(рис. 2, а, *вверху*). В первом масс-спектрометре смесь ионизированных пептидов сортируется таким образом, чтобы только один тип фрагментов, полученных при расщеплении, мог достичь следующего отсека. Этот образец, каждая молекула которого имеет определенный заряд, проходит через вакуумную камеру между двумя масс-спектрометрами. В этой так называемой «камере соударений» пептид разрушается на еще более мелкие части под действием активных соударений с молекулами инертного газа (аргона или гелия), подаваемого в камеру. Процесс проводится в таких условиях, чтобы каждый отдельный пептидный фрагмент был разделен в среднем не более чем на две части. Большинство разрывов связей приходится на пептидные. В данной реакции молекулы воды не участвуют, так как все происходит в вакуумной камере, поэтому среди продуктов реакции встречаются радикалы, например карбонильные радикалы (рис. 2, а). Заряд, находившийся на исходном фрагменте, теперь сосредоточен на одной из его частей.

Во втором масс-спектрометре происходит изменение отношений m/z всех заряженных фрагментов (незаряженные частицы не регистрируются). В результате получают одну или несколько серий пиков. Данная серия пиков (рис. 2, б) отражает наличие всех заряженных фрагментов, которые образовались при разрыве одного и того же типа связи (но в разных частях полипептидной молекулы) с одной и той же стороны связи (N или C). Соседние пики в одной серии различаются на одну аминокислоту. По разнице молекулярных масс соответствующих пиков можно определить, какая именно аминокислота стоит следующей в полипептидной цепи. Сложность возникает только с идентификацией лейцина и изолейцина, поскольку они имеют одинаковые молекулярные массы.

При разрушении пептида заряд может сохраняться как на N-концевом, так и на C-концевом фрагменте, кроме того, возможен распад молекулы не по пептидной связи, а в других местах, так что обычно в одном эксперименте получают несколько серий пиков. Два наиболее рельефных спектра обычно относятся к заряженным фрагментам, полученным при разрыве пептидных связей, причем набор C-концевых фрагментов очень легко отличить от набора N-концевых фрагментов. Дело в том, что

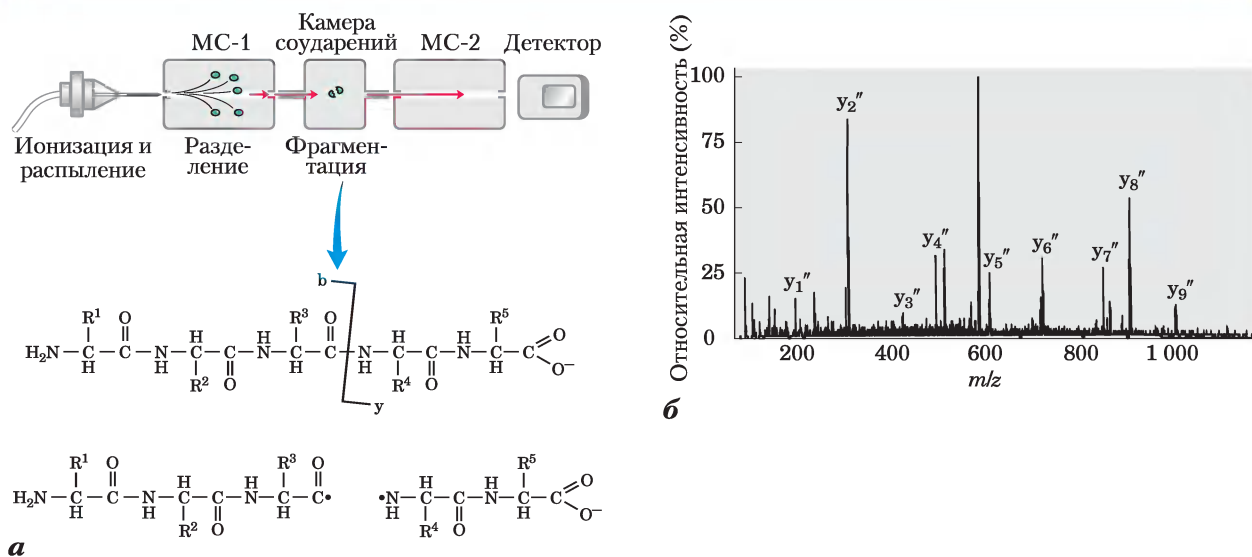


Рис. 2. Определение аминокислотной последовательности методом тандемной масс-спектрометрии. *а*) Раствор белка после протеолитического расщепления вводят в масс-спектрометр (МС-1). Пептиды сортируют, отбирая для дальнейшего анализа лишь один тип фрагментов. Этот фрагмент далее подвергают фрагментации в камере, расположенной между двумя масс-спектрометрами. Во втором масс-спектрометре (МС-2) определяют значение m/z для каждого фрагмента. Многие образовавшиеся при фрагментации ионы получаются в результате разрыва пептидных связей. На рисунке они обозначены как ионы b -типа и y -типа в зависимости от того, остался заряд на С- или на N-конце фрагмента. *б*) Типичный спектр, полученный при обработке пептида, состоящего из 10 аминокислотных остатков. Помеченные пики соответствуют ионам y -типа. Самый высокий пик (соседний с пиком y_5'') соответствует иону с удвоенным зарядом и не относится к данной серии. Пики отличаются друг от друга на одну аминокислоту, стоящую рядом в пептидной цепи. В данном случае получена пептидная последовательность Phe-Pro-Gly-Gln-(Ile/Leu)-Asn-Ala-Asp-(Ile/Leu)-Arg. Заметьте, что существует неопределенность в идентификации лейцина и изолейцина, имеющих одинаковую молекулярную массу. В нашем примере серия пиков, относящихся к y -типу ионов, является преобладающей, что сильно облегчает расшифровку спектра. Это связано с тем, что на С-конце пептида расположен остаток Arg, на котором сосредоточена большая часть положительного заряда.

в процессе фрагментации в камере соударений в местах разрыва не образуется обычных карбоксильных или аминогрупп. Единственными полноценными α -амино- и α -карбоксильными группами являются группы, расположенные на самых концах фрагментов (рис. 2, *а*). В связи с этим два набора фрагментов имеют небольшие различия в молекулярных массах. Определение аминокислотной последовательности по двум наборам фрагментов повышает точность анализа.

Если известна нуклеотидная последовательность гена, то для однозначного соотнесения гена с белком обычно достаточно прочесть лишь короткий фрагмент аминокислотной последовательности. Секвенирование с помощью масс-спектрометрии не может заменить секвенирования длинных фрагментов по методу Эдмана, но этот метод идеально подходит для исследований в области протеомики, направленных на каталогизацию сотен клеточных белков, которые можно разделить методом двумерного электрофореза.

кода (гл. 27) и появлением методов идентификации генов (гл. 9) стало возможным определять аминокислотную последовательность полипептида на основании нуклеотидной последовательности кодирующего его гена (рис. 3-28). Методы определения последовательностей ДНК и белка дополняют друг друга. Для белка, ген которого доступен, секвенирование ДНК может дать более быстрые и точные результаты, чем секвенирование самого белка. Аминокислотные последовательности большинства белков теперь определяют именно таким косвенным методом. Если ген не выделен, то необходимо проводить секвенирование белка, причем полученный результат дает больше информации, чем анализ последовательности ДНК, который, например, ничего не говорит о расположении в молекуле дисульфидных связей. Кроме того, знание аминокислотной последовательности даже небольшого участка полипептидной цепи может в значительной степени облегчить выделение соответствующего гена (гл. 9).

Существующие сегодня методы анализа белков и нуклеиновых кислот дали возможность для развития новой дисциплины — «биохимия целых клеток». Теперь можно изучать последовательности всей ДНК (генома) самых разных организмов — от вирусов и бактерий до многоклеточных организмов (табл. 1-2). Новые гены открывают тысячами, причем часть из них кодирует белки с пока неизвестными функциями. Для описания всего комплекса белков, кодируемых в геноме организма, ученые предложили использовать термин «протеом». Как будет обсуждаться далее в гл. 9, новые дисциплины протеомика и геномика — это взаимодополняющие разделы исследований в области клеточного метаболизма и метаболизма нуклеиновых кислот, направленные на создание все более полной картины биохимии клеток и целых организмов.

Аминокислотная последовательность (белок)	Gln—Tyr—Pro—Thr—Ile—Trp
Последовательность ДНК (ген)	CAGTATCCCTACGATTTGG

Рис. 3-28. Соответствие последовательностей ДНК и аминокислот. Каждая аминокислота кодируется специфической последовательностью трех нуклеотидов в цепи ДНК. Подробно о генетическом коде см. гл. 27.

Небольшие пептиды и белки можно синтезировать химическим путем

Многие пептиды используются в фармакологии, поэтому их синтез сопряжен с определенным коммерческим интересом. Есть три способа, с помощью которых можно получить пептид: 1) выделить его из ткани, что часто затруднено из-за его крайне низкой концентрации; 2) получить генно-инженерным путем (гл. 9); 3) синтезировать химическим путем. Во многих случаях методы прямого химического синтеза являются предпочтительными. Кроме коммерческого приложения химический синтез используется для создания специфических пептидных фрагментов, необходимых для изучения структуры и функций белков.

Традиционные методы синтеза органических соединений не годятся для получения пептидов и белков, имеющих в цепочке более 4–5 аминокислотных остатков, что связано с особой сложностью белковых структур. Одна из возникающих на этом пути проблем состоит в очистке продукта после его синтеза.

Большой вклад в развитие методов синтеза пептидов был сделан Робертом Брюсом Меррифилдом в 1962 г. Он предложил синтезировать пептид,



Роберт Брюс Меррифилд, 1921–2006

закрепив один его конец на твердой подложке. В качестве подложки можно использовать нерастворимый полимер (смола), помещенный в колонку, похожую на те, что используются в хроматографии. К закрепленному на подложке пептиду с помощью стандартного набора реакций пришивают по одной аминокислоте, а затем повторяя цикл с другой аминокислотой (рис. 3-29). На каждой стадии цикла используют защитные химические группы, предотвращающие побочные реакции.

Теперь технология химического пептидного синтеза автоматизирована. Аналогично реакциям секвенирования, данный процесс ограничивается

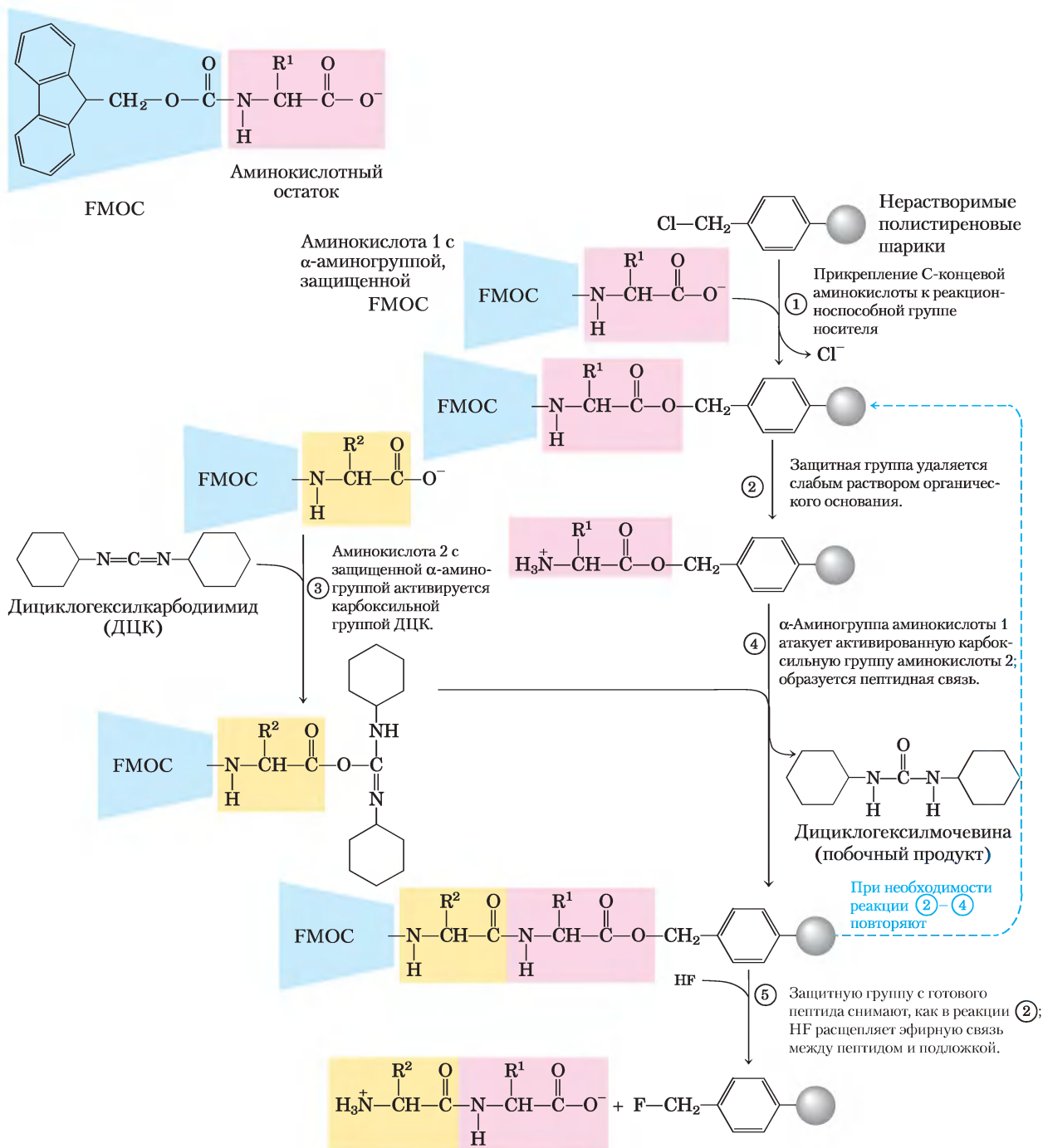


Рис. 3-29. Химический синтез пептида на твердой подложке. Для образования каждой пептидной связи необходимо осуществление реакций 1–4. Защитная флуоренилметоксикарбонильная группа (Fmoc, выделена синим цветом) предотвращает побочные реакции по α -аминогруппе аминокислотного остатка (выделены красным цветом). Химический синтез протекает в направлении от C-конца к N-концу пептидной цепи, т. е. в противоположном направлении по сравнению с синтезом *in vivo* (гл. 27).

Таблица 3-8

Влияние выхода продукта на отдельных стадиях на общий выход пептидного синтеза

Число остатков в конечном полипептиде	Общий выход готового продукта (%) в зависимости от выхода на каждой стадии	
	96,0%	99,8%
11	66	98
21	44	96
31	29	94
51	13	90
100	1,8	82

эффективностью каждого отдельного реакционного цикла (это можно понять, рассчитав суммарную эффективность процесса, каждая стадия которого идет с выходом 96,0 или 99,8% (табл. 3-8)). Неполное проведение реакции на одной стадии приводит на следующей стадии к образованию примеси (более короткого пептида). Усовершенствование химических методов позволило с хорошим выходом синтезировать белки, состоящие из 100 аминокислот, всего за несколько дней. Очень близкий подход используется для синтеза нуклеиновых кислот (рис. 8-35). И все же методы лабораторного синтеза по-прежнему ничто по сравнению с биосинтезом в живых организмах! В бактериальной клетке такой же белок из 100 аминокислот синтезируется с высочайшей точностью приблизительно за пять секунд.

Новые эффективные методы лигирования (сшивания) отдельных пептидных фрагментов позволяют собирать из синтетических пептидов более крупные белки. С помощью таких методов можно создавать новые белки, в которых химические группы, в том числе и не встречающиеся в природных белках, расположены в строго определенных местах. Новые белки позволяют изучать механизмы ферментативного катализа, создавать белки с новыми химическими свойствами и заданной структурой. Последнее окончательно убеждает нас в том, что есть связь между первичной структурой белка и его пространственной структурой в растворе.

Аминокислотная последовательность служит источником важной биохимической информации

Знание аминокислотной последовательности белка позволяет понять его трехмерную струк-

туру, функции, локализацию в клетке и эволюцию. Важнейшую информацию можно получить, сравнивая аминокислотные последовательности данного белка и других известных белков. В Интернете есть доступ к базам данных, содержащим тысячи известных на сегодняшний день последовательностей. Сравнение новой последовательности с этим банком данных часто позволяет выявить как определенные особенности, так и общие закономерности.

До сих пор мы не знаем точно, каким образом аминокислотная последовательность определяет трехмерную структуру; мы также не в состоянии однозначно предсказать функции белка по его аминокислотной последовательности. Однако на основании сходства аминокислотной последовательности данного белка с другими белками его можно отнести к одному из известных семейств белков, отличающихся определенными функциональными и структурными особенностями. Члены семейства обычно имеют аминокислотные последовательности, совпадающие как минимум на 25%, а также обладают некоторыми общими структурными и функциональными характеристиками. Существуют, однако, семейства, члены которых имеют лишь несколько идентичных аминокислотных остатков, необходимых для реализации определенной функции. Кроме того, многие белки, выполняющие различные функции, имеют сходные надмолекулярные структуры (так называемые домены, см. гл. 4). Эти домены часто образуют специфические структуры, обладающие неожиданно высокой устойчивостью или приспособленными к существованию в определенном окружении. Кроме того, на основании структурного и функционального сходства между семействами белков можно сделать определенные заключения относительно их эволюционного развития.

Некоторые аминокислотные последовательности служат сигналами, определяющими их клеточную локализацию, необходимости химической модификации и указывают на время жизни белков. Специальные сигнальные последовательности, обычно расположенные на N-конце белка, используются для маркировки белков, транспортируемых за пределы клетки; существуют также белки, предназначенные для локализации в ядре, на клеточной поверхности или в других отделах клетки.

Дополнение 3–3 Консенсусные последовательности и Sequence logos

Консенсусные последовательности можно изобразить несколькими различными способами. Для иллюстрации двух вариантов представления данных мы используем два примера консенсусных последовательностей, изображенных на рис. 1: *а*) АТФ-связывающая структура, называемая Р-петлей (см. доп. 12-2); *б*) Ca^{2+} -связывающая структура, называемая EF-рукой (см. рис. 12-11). Приведенные здесь правила — адаптированный вариант правил, используемых веб-сайтом PROSITE (expasy.org/prosite); в этой программе для обозначения аминокислотных остатков применяется однобуквенный код.

В одном способе представления консенсусных последовательностей (верхние строки на рисунках *а* и *б*) каждая позиция отделена от соседней позиции черточкой. Позиция, в которой может находиться любая аминокислота, обозначается через *x*. В случае неопределенности в квадратных скобках перечисляются все возможные аминокислоты. Например, на рисунке *а* [AG] означает Ala или Gly. Если в какой-либо позиции могут находиться практически любые аминокислоты, за некоторым исключением, тогда на месте этой позиции в фигурных скобках перечисляются именно те аминокислоты, которые не могут здесь стоять. Например, на рис. 1, *б* {W} означает, что здесь не может находиться аминокислота Trp. Повторение какого-либо элемента последовательности обозначают с помощью числа или нескольких чисел, взятых в скобки и стоящих после этого элемента. Так, на рисунке *а* *x*(4) означает *x*-*x*-*x*-*x*, а (2,4) означает *x*-*x*, *x*-*x*-*x* или *x*-*x*-*x*-*x*. Если рассматриваемый участок является N-концом или C-концом последовательности, то запись начинают или заканчивают им (в примерах не так). В конце фрагмента ставится точка. Применяя эти правила к консенсусной последовательности (*а*), получаем, что в первой позиции может стоять A или G. В следующих четырех позициях могут располагаться любые аминокислоты, далее обязательно идут G и K, а последнюю позицию занимает S или T.

Система записи Sequence logos обеспечивает возможность более информативного графического представления выравнивания множества аминокислотных (или нуклеотидных) последовательностей. В каждой позиции указан определенный набор символов, соответствующий тем аминокислотам (или нуклеотидам), которые могут здесь располагаться.

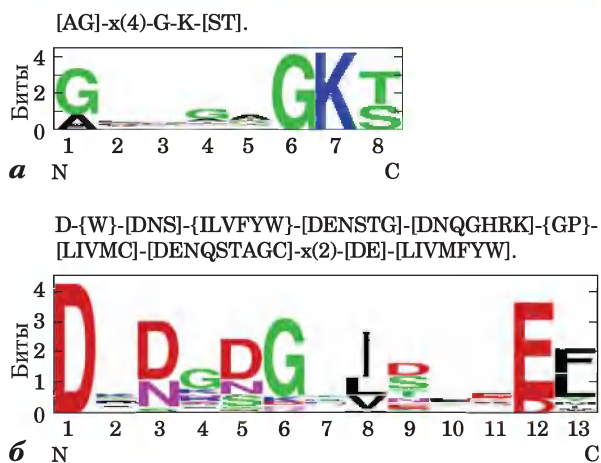


Рис. 1. Представление двух консенсусных последовательностей. *а*) Р-петля — АТФ-связывающая структура; *б*) EF-рука — Ca^{2+} -связывающая структура.

Общая высота символа (в битах) отражает степень консервативности этой позиции, а высота каждого отдельного символа внутри множества указывает на относительную частоту встречаемости именно этой аминокислоты (нуклеотида). В аминокислотных последовательностях цветом обозначены характеристики аминокислот: полярные аминокислоты (G, S, T, Y, C, Q, N) зеленые, основные (K, R, H) синие, кислые (D, E) красные, а гидрофобные (A, V, L, I, P, W, F, M) черные. Классификация аминокислот в данной схеме несколько отличается от той, что представлена в табл. 3-1 и на рис. 3-5. Аминокислоты с ароматической структурой боковой цепи относят как к неполярным (F, W), так и к полярным (Y). Глицин, который всегда трудно поддается классификации, принято считать полярным. Если в одной позиции могут находиться одна или небольшое число аминокислот, редко бывает так, что они встречаются в этой позиции с равной вероятностью. Одна или несколько аминокислот обычно преобладают. Данный способ представления делает это преобладание более выраженным, а консервативную последовательность в белке — более очевидной. Однако при этом скрыты некоторые аминокислоты, которые могли бы находиться в определенной позиции, например Cys, который иногда встречается в позиции 8 в мотиве EF-руки (рис. 1, *б*).

Определенные последовательности служат участками связывания простетических групп, таких как остатки сахаров в гликопротеинах и липиды в липопротеинах. Некоторые из этих сигнальных последовательностей хорошо изучены и легко распознаются в аминокислотной последовательности нового белка (гл. 27).

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Значительная доля функциональной информации, содержащейся в последовательности белка, заключена в **консенсусных последовательностях**. Этим термином обозначают соответствующие последовательности не только в белке, но также в ДНК и РНК. При сравнении наборов родственных аминокислотных или нуклеотидных последовательностей выявляют позиции, в которых чаще всего стоят одни и те же аминокислоты или нуклеотиды; это и есть консенсусные последовательности. Участки последовательности, отличающиеся наибольшим сходством в ряде организмов, часто соответствуют эволюционно консервативным функциональным доменам. Для анализа и поиска консенсусных последовательностей создан целый набор математических приемов и программ, доступных через Интернет. В доп. 3-3 представлены общие принципы изображения консенсусных последовательностей. ■

Белковая последовательность проливает свет на развитие жизни на Земле

Простая последовательность букв аминокислотной последовательности не дает полного представления о том богатстве информации, которое на самом деле заключено в этой последовательности. По мере роста числа известных белковых последовательностей появляются все более мощные методы, позволяющие извлечь из них самую разную информацию. Анализ информации, хранящейся в постоянно расширяющихся биологических базах данных, содержащих последовательности генов и белков, а также структуры макромолекул, привел к становлению **биоинформатики** как новой области знаний. Один из результатов развития этой дисциплины заключается в появлении серий компьютерных программ, многие из которых доступны через Интернет и их могут использовать ученые, студенты и даже непрофессиона-

лы. Функции каждого белка связаны с его трехмерной структурой, которая, в свою очередь, во многом определяется первичной последовательностью. Таким образом, биохимическая информация, отраженная в аминокислотной последовательности, в принципе ограничена нашими собственными знаниями о структурных и функциональных принципах организации белков. Постоянно развивающийся аппарат биоинформатики позволяет идентифицировать функциональные сегменты в новых белках и установить как их последовательность, так и их структурную связь с уже известными белками. Кроме того, изучение белковых последовательностей с эволюционной точки зрения позволяет нам понять, как возникали белки и, в конечном итоге, как развивалась жизнь на нашей планете.

Историю молекулярной эволюции обычно связывают с работами Лайнуса Полинга и Эмиля Цукеркандла, которые в середине 1960-х гг. стали активно использовать нуклеотидные и аминокислотные последовательности для изучения эволюционного процесса. Основа этой науки обманчиво проста. Если два организма родственны друг другу, то последовательности их генов и белков должны быть похожи. По мере эволюционного расхождения организмов эти последовательности начинают сильно различаться. Перспективы развития такого подхода стали проясняться в 1970-х гг., когда Карл Вёзе использовал последовательности рибосомных РНК для выделения архей в отдельную группу, не принадлежащую к бактериям или эукариотам (рис. 1-4). Белковые последовательности часто предоставляют возможность для уточнения имеющейся информации. По мере реализации проектов по изучению геномов самых разных организмов, от бактерии до человека, число доступных последовательностей растет с огромной скоростью. Эту информацию можно использовать, чтобы проследить ход эволюции. Проблема заключается в расшифровке генетических иероглифов.

Эволюция не следует простым линейным путем. Сложности возникают при каждой попытке извлечь связанную с эволюцией информацию, заключенную в белковых последовательностях. В каждом конкретном белке на протяжении всего хода эволюции неизменными оставались аминокислотные остатки, имеющие

наибольшее значение для его функций. Остатки, не играющие такой важной роли в активности белка, могли со временем меняться, т. е. одна аминокислота могла заменить другую, и именно эти изменившиеся остатки могут сказать что-то о ходе эволюционного процесса. Но аминокислотные замены не всегда случайны. В некоторых участках аминокислотной последовательности возможны только строго определенные замены, что связано с необходимостью сохранения функции белка. Аминокислотный состав некоторых белков изменялся сильнее, чем других. По этим и другим причинам скорость, с которой белки эволюционируют, разная.

Еще один фактор, мешающий проследить ход эволюции, — перенос генов или групп генов от одного организма в другой, называемый **горизонтальным (латеральным) переносом генов**. Перенесенные гены могут быть довольно похожими на те, что были в исходном организме, в то время как большинство остальных генов в этих двух организмах имеют лишь весьма отдаленное сходство. Результатом горизонтального переноса генов является наблюдающееся сегодня быстрое распространение устойчивости к антибиотикам в популяции бактерий. Белки, синтезируемые на основе этих перенесенных генов, будут неудачными кандидатами для изучения эволюции бактерий, поскольку история их эволюции в новом «хозяйском» организме очень коротка.

Предметом исследования в молекулярной эволюции обычно служат семейства близкородственных белков. Для анализа отбирают семейства белков, играющих важную роль в клеточном метаболизме, поскольку они обязательно должны были присутствовать и в клетках-предшественниках, а это сильно снижает вероятность их появления в клетках в результате горизонтального переноса генов. Например, белок eEF-1 α (фактор элонгации 1 α) участвует в синтезе белка у всех эукариот. Похожий белок EF-Tu обнаружен в клетках бактерий. Сходство последовательностей и выполняемых функций говорит о том, что eEF- α 1 и EF-Tu являются членами семейства белков, произошедшего от общего предшественника. Белки, входящие в состав семейства, называют **гомологичными белками**, или **гомологами**. Если два члена семейства, т. е. два

гомолога, присутствуют в организмах одного вида, их называют **паралогами**. Гомологичные белки из организмов разных видов называют **ортологами**. Для изучения процесса эволюции в первую очередь необходимо идентифицировать подходящие семейства гомологичных белков, а затем уже на их основе восстановить ход эволюции.

Идентификация гомологов осуществляется с помощью мощных компьютерных программ, которые позволяют напрямую сравнивать две или несколько белковых последовательностей, а также осуществлять поиск близких последовательностей в базах данных. Процесс электронного поиска можно представить себе как скольжение одной последовательности по другой до того момента, пока не будет найден участок достаточного сходства. В данном процессе выравнивания последовательностей каждая позиция, в которой аминокислоты из двух аминокислотных последовательностей совпадают, получает определенный вес, различающийся в зависимости от использованной компьютерной программы; этот вес служит показателем качества выравнивания. На данном пути возникают определенные сложности. Иногда сравниваемые белки достаточно хорошо совпадают, скажем, на двух участках последовательностей, разделенных между собой менее схожими участками разной длины. Тогда одновременное выравнивание двух совпадающих участков невозможно. Для решения этой проблемы компьютерная программа вводит в одну из последовательностей пробел таким образом, чтобы два схожих участка могли накладываться друг на друга одновременно (**рис. 3-30**). Очевидно, что с использованием достаточного количества пробелов практически любые две последовательности можно некоторым образом выровнять. Чтобы избежать неинформативного выравнивания, компьютерная программа за каждый пробел вычитает определенный штраф, тем самым снижая вес выравнивания. Далее программа отбирает оптимальное выравнивание, при котором число идентичных аминокислотных остатков максимально, а число пробелов минимально.

Расположение идентичных аминокислот часто не позволяет определить степень родства белков в эволюционном плане. Более полезно в

E. coli TGNRTI AVYDLGGGTFDISIIEIDEVDGEKTFEVLATNGDTHLGGEDFDSRLIHYL
B. subtilis DEDQTILLYDLGGGTFDVSILELGDG TFEVRSTAGDNRLGGDDFDQVIDHL

┌
 └
 Пробел

Рис. 3-30. Выравнивание белковых последовательностей с использованием пробелов.

Здесь представлены короткие участки белка Hsp70 (широко распространенного класса белков-шаперонов) из двух хорошо изученных бактерий – *E. coli* и *Bacillus subtilis*. Введение пробела в аминокислотную последовательность *B. subtilis* позволяет лучше осуществить выравнивание с каждой стороны от пробела. Желтым цветом выделены идентичные аминокислотные остатки.

этом смысле исследование химических свойств аминокислотных замен. Аминокислотные замены в семействе белков часто бывают консервативными; это означает, что один аминокислотный остаток заменен другим, но с близкими химическими свойствами. Например, в одном белке семейства в определенной позиции находится Glu, а в другом – Asp; заметьте, что оба остатка несут отрицательный заряд. Из логических соображений такая консервативная замена позволит осуществить более надежное выравнивание, чем неконсервативная замена того же Asp, например, на гидрофобный остаток Phe.

В большинстве случаев для поиска гомологов и выяснения эволюционного родства белковые последовательности (как полученные в результате прямого аминокислотного секвенирования, так и выведенные на основании последовательности ДНК) более предпочтительны, чем не кодирующие нуклеотидные последовательности (те, которые не кодируют последовательности белка или функциональной РНК). В случае нуклеиновых кислот, построенных всего из четырех различных остатков, случайное выравнивание негомологичных последовательностей обычно приводит к совпадению как минимум 25% позиций. Введение нескольких пробелов часто может повысить эту значение до 40% и более; в результате вероятность выравнивания неродственных последовательностей очень высока. Наличие 20 различных аминокислот в белке значительно снижает возможность неинформативного выравнивания подобного рода.

Все программы выравнивания последовательностей снабжены методами тестирования надежности выравнивания. В одном из тестов аминокислотную последовательность одного из сравниваемых белков перемешивают для получения случайной последовательности, а затем

запускают программу выравнивания для сравнения ее с исходной последовательностью. Новое выравнивание вновь характеризуют весом, а процессы перемешивания и выравнивания можно повторять много раз. Первое выравнивание, осуществленное до перемешивания, должно иметь гораздо больший вес, чем выравнивания случайных последовательностей. В таком случае существует уверенность, что выровненные последовательности действительно принадлежат двум гомологам. Заметьте, что *отсутствие* значительного веса выравнивания не обязательно означает отсутствие эволюционной связи двух белков. Как мы увидим в гл. 4, иногда при изучении трехмерных структур становится очевидным эволюционное родство, хотя гомология последовательностей не была обнаружена.

Для изучения эволюционного родства стараются использовать семейства белков со сходными функциями из максимально возможного диапазона организмов. Полученная информация может быть использована для слежения за ходом эволюции этих организмов. На основании анализа расхождений в выбранных семействах белков исследователь может разделить организмы на классы в соответствии с их эволюционными связями. Эти данные должны соответствовать результатам классических исследований по физиологии и биохимии организмов.

Некоторые участки белковой последовательности могут встречаться у организмов, относящихся к одной таксономической группе, но не к другим группам. Эти участки можно использовать в качестве **маркерных последовательностей** для тех групп, в которых они были обнаружены. Примером такой маркерной последовательности является вставка из 12 аминокислот в N-концевой области белков eEF- α 1/EF-Tu у всех архей и эукариот, но не у бактерий

		Маркерная последовательность
Археи	<i>Halobacterium halobium</i> <i>Sulfolobus solfataricus</i>	I G H V D H G K S T M V G R L L Y E T G S V P E H V I E Q H
		I G H V D H G K S T L V G R L L M D R G F I D E K T V K E A
Эукариоты	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Homo sapiens</i>	I G H V D S G K S T T T G H L I Y K C G G I D K R T I E K F
		I G H V D S G K S T T T G H L I Y K C G G I D K R T I E K F
Грамположительные бактерии	<i>Bacillus subtilis</i>	I G H V D H G K S T M V G R I T T V
Грамотрицательные бактерии	<i>Escherichia coli</i>	I G H V D H G K T T L T A A I T T V

Рис. 3-31. Маркерная последовательность семейства белков eEF- α 1/EF-Tu. Маркерная последовательность (обведена рамкой) представляет собой вставку из 12 аминокислотных остатков, расположенную в N-концевой области. Совпадающие во всех последовательностях основания выделены желтым цветом. Маркерная последовательность существует как у архей, так и у эукариот, хотя в двух группах организмов эти вставки довольно сильно различаются. Изменения внутри маркерной последовательности отражают значительное эволюционное расхождение, которое произошло на этом участке после того, как он впервые появился у общего предшественника обеих групп.

(рис. 3-31). Маркерные последовательности являются одним из тех ключей, которые помогают установить эволюционную связь между эукариотами и археями. Другие характерные последовательности позволяют установить эволюционные связи между группами организмов на многих таксономических уровнях.

Анализируя полные аминокислотные последовательности белков, можно построить более совершенные эволюционные деревья со многими видами в каждой таксономической группе. На рис. 3-32 показано такое дерево для бактерий, построенное на основании расхождений в последовательности белка GroEL (белок, присут-

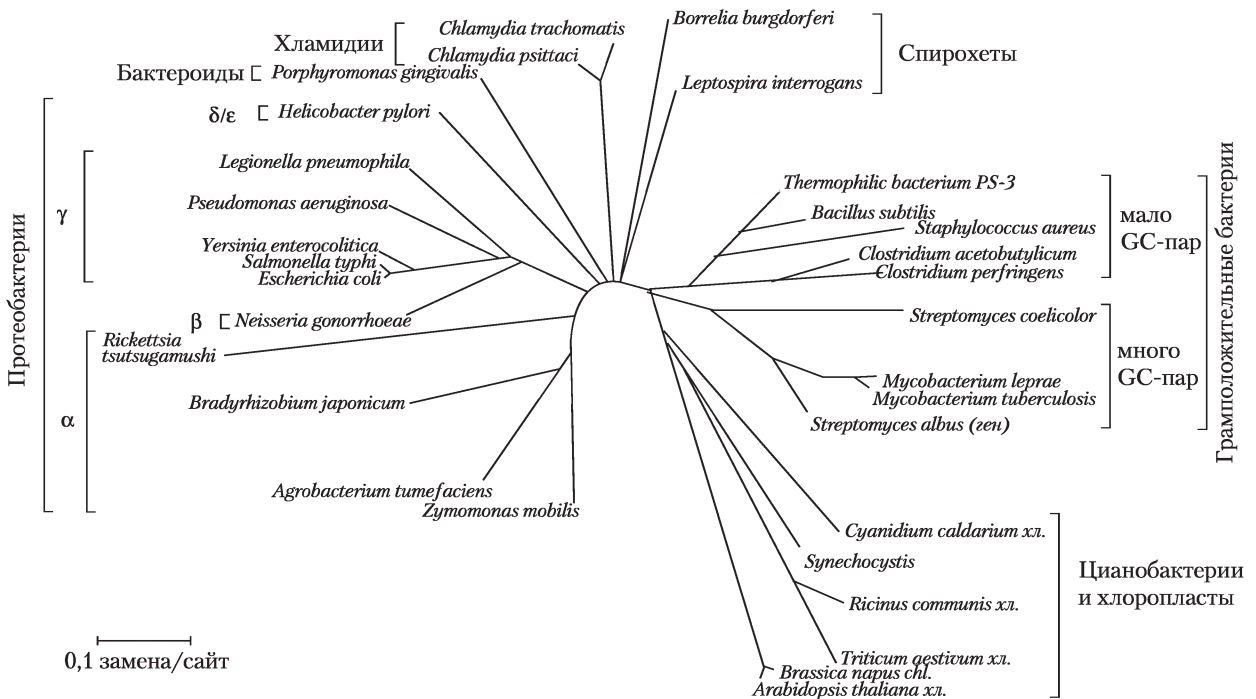


Рис. 3-32. Эволюционное дерево, построенное на основании сравнения аминокислотных последовательностей. Здесь представлено эволюционное дерево бактерий, основанное на расхождении аминокислотных последовательностей семейства белков GroEL. Кроме того, на древе указано расположение хлоропластов (хл.) некоторых других видов организмов.

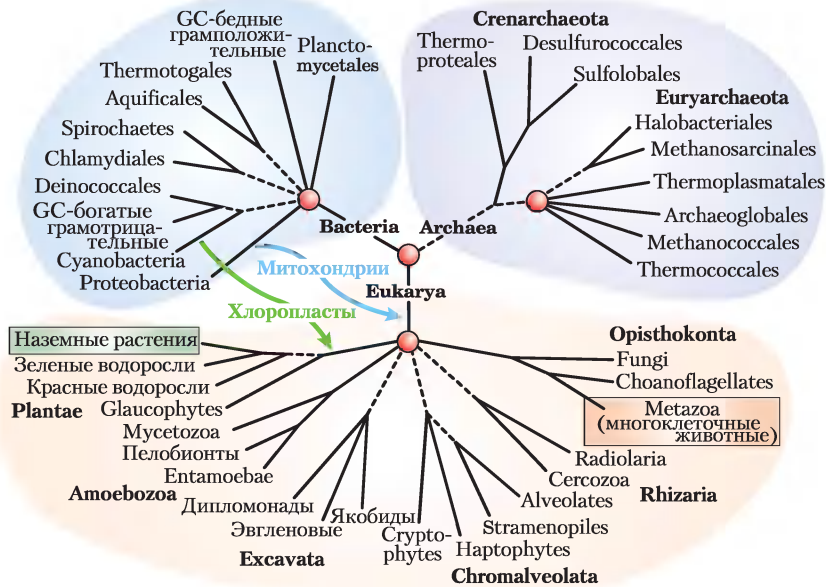


Рис. 3-33. Консенсусное древо жизни. Показанное здесь древо основано на анализе многих белковых последовательностей и дополнительных особенностей генома. Ветви, обозначенные пунктиром, еще исследуются. Такое древо представляет только часть доступной информации, и только часть проблем нашла в нем свое решение. Каждая ныне живущая группа имеет свою собственную сложную историю эволюции.

ствующий во всех бактериях и необходимый для нормального фолдинга). Древо можно дополнительно усовершенствовать, используя анализ последовательностей многих белков, а также привлекая данные об уникальных биохимических и физиологических свойствах организмов каждого вида. Существует множество способов для построения эволюционного древа, каждый из которых имеет как преимущества, так и недостатки, а также множество способов представления эволюционных отношений. Окончания ветвей на древе, изображенном на рис. 3-32, соответствуют существующим в наши дни видам, названия которых указаны. Точки, в которых сходятся две линии, соответствуют их вымершему предку. В большинстве способов изображения деревьев, в том числе и на рис. 3-32, длина линий между точками пропорциональна числу аминокислотных замен, отличающих один вид от другого. Таким образом, если мы рассмотрим точки, соответствующие двум существующим видам и их общему предшественнику, то длина каждой линии, соединяющей

окончание ветви с местом ее ответвления, соответствует числу аминокислотных замен, отличающих каждый существующий вид от предшественника. Сумма длин линий, исходящих из точки ветвления к концам ветвей, отражает число аминокислотных замен, на которое эти существующие ныне организмы отличаются между собой. Чтобы определить промежутки времени, необходимые для расхождения видов, древо следует откалибровать в соответствии с данными анализа ископаемых остатков и с другой имеющейся информацией.

По мере увеличения объема информации в банках данных становится возможным построение эволюционных деревьев на основании последовательностей все большего числа различных белков. Благодаря все более усложняющимся методам анализа продолжает возрастать количество генетической информации, так что структура этих деревьев может быть дополнительно уточнена. Все подобные работы продвигают нас к цели создания подробного древа жизни, описывающего эволюцию и взаимоотно-

шения всех организмов на Земле. Развитие данной области науки продолжается (рис. 3-33); поставленные в ней вопросы важны для осознания человеком самого себя и окружающего мира. Молекулярная эволюция обещает быть одной из наиболее живых отраслей науки двадцать первого века.

Краткое содержание раздела 3.4

СТРУКТУРА БЕЛКА: ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА

- Различные функции белков определяются их аминокислотным составом и аминокислотной последовательностью. Некоторые небольшие изменения аминокислотной последовательности белка могут не сопровождаться изменениями его функций.
- Определение аминокислотной последовательности пептида происходит в несколько стадий: 1) разделение полипептида на более короткие фрагменты с помощью реагентов, расщепляющих специфические пептидные связи; 2) определение аминокислотной последовательности каждого фрагмента по методу Эдмана; 3) определение расположения фрагментов в исходной полипептидной цепи с помощью создания другого набора перекрывающихся фрагментов. Аминокислотную последовательность, кроме того, можно вывести на основании известной нуклеотидной последовательности соответствующего гена.
- Короткие белки и пептиды (до 100 остатков) можно синтезировать химическим путем. На каждой стадии синтеза происходит присоединение одной аминокислоты, причем вся пептидная цепь постоянно удерживается на твердом носителе.
- Аминокислотная последовательность белка является важным источником информации не только о структуре и функции белка, но и об эволюции жизни на нашей планете. Разработаны сложные методы, позволяющие проследить ход эволюции на основании анализа изменений аминокислотных последовательностей гомологичных белков.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

D/L система 117	Олигомерный белок 130
R-группа 114	Олигопептид 128
Абсолютная конфигурация 117	Ортолог 157
Аминокислота 114	Паралог 157
Аффинная хроматография 135	Пептид 127
Белок 127	Пептидная связь 127
Биоинформатика 156	Первичная структура 141
Вторичная структура 141	Поглощение (A) 121
Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) 135	Полипептид 128
Гомолог 157	Полярность 118
Гомологичные белки 157	Простетическая группа 131
Горизонтальный перенос генов 157	Протеазы 146
Диализ 132	Протеом 152
Додецилсульфат натрия (SDS) 136	Протомер 130
Изоэлектрическая точка (pI) 125	Реакция Эдмана 145
Изоэлектрофокусирование 137	Сложные белки 131
Ионообменная хроматография 132	Сырой экстракт 132
Колоночная хроматография 132	Третичная структура 141
Консенсусная последовательность 156	Фракция 132
Маркерная последовательность 158	Фракционирование 132
	Хиральный центр 115
	Цвиттер-ион 123
	Четвертичная структура 141
	Эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация) 135
	Электрофорез 136
	Энантиомеры 115

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Аминокислоты

- Dougherty, D.A.** (2000) Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 645–652.
- Greenstein, J.P. & Winitz, M.** (1961) *Chemistry of the Aminoacids*, 3 Vols, John Wiley & Sons, New York.
- Kreil, G.** (1997) D-Amino acids in animal peptides. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 337–345.

Последние данные относительно встречаемости этих необычных стереоизомеров аминокислот.

Meister, A. (1965) *Biochemistry of the Amino Acids*, 2nd ed., Vols 1 & 2, Academic Press, Inc., New York.

Энциклопедический труд, посвященный свойствам, распространенности и метаболизму аминокислот.

Пептиды и белки

Creighton, T.E. (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York.

Очень полезный источник общего плана.

Как работать с белками

Dunn, M.J. & Corbett, J.M. (1996) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* **271**, 177–203.

Детальное описание метода.

Kornberg, A. (1990) Why purify enzymes? *Methods Enzymol.* **182**, 1–5.

Критический обзор классических биохимических методов.

Scopes, R.K. (1994) *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd ed., Springer-Verlag, New York.

Хороший источник информации о принципах хроматографии и других биохимических методов.

Первичная структура белка и эволюция

Andersson, L., Blomberg, L., Flegel, M., Lepsa, L., Nilsson, B., & Verlander, M. (2000) Large-scale synthesis of peptides. *Biopolymers* **55**, 227–250.

Обсуждение существующих подходов к созданию пептидов для фармакологических нужд.

Dell, A. & Morris, H.R. (2001) Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science* **291**, 2351–2356.

Масс-спектрометрия как метод выбора для классификации сложных гликопротеинов.

Delsuc, F., Brinkmann, H., & Philippe H. (2005) Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 361–375.

Gogarten, J.P. & Townsend, J.P. (2005) Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 679–687.

Gygi, S.P. & Aebersold, R. (2000) Mass spectrometry and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 489–494.

Использование масс-спектрометрии для идентификации и изучения клеточных белков.

Koonin, E.V., Tatusov, R.L., & Galperin, M.Y. (1998) Beyond complete genomes: from sequence to structure and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 355–363.

Полезное обсуждение возможностей, возникающих в результате определения аминокислотных последовательностей огромного числа белков.

Li, W.-H. & Graur, D. (2000) *Fundamentals of Molecular Evolution*, 2nd edn, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.

Очень доступное описание методов анализа последовательностей белков и нуклеиновых кислот. В гл. 5 представлено одно из лучших описаний того, как построить по данным секвенирования эволюционное древо.

Mann, M. & Wilm, M. (1995) Electrospray mass spectrometry for protein characterization. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 219–224.

Обсуждение основ данного метода для начинающих.

Mayo, K.H. (2000) Recent advances in the design and construction of synthetic peptides: for the love of basics or just for the technology of it. *Trends Biotechnol.* **18**, 212–217.

Miranda, L.P. & Alewood, P.F. (2000) Challenges for protein chemical synthesis in the 21st century: bridging genomics and proteomics. *Biopolymers* **55**, 217–226.

Эта и предыдущая статьи описывают методы синтеза пептидов и их сплайсинга для решения многих проблем в биохимии белка.

Rokas, F., Williams, B.L., King, N., & Carroll, S.B. (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425**, 798–804.

Как из сравнения множества последовательностей белков получить информацию об эволюционном процессе.

Sanger, F. (1988) Sequences, sequences, sequences. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 1–28.

Интересный исторический обзор развития методов секвенирования.

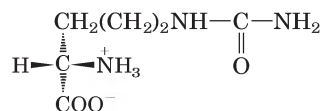
Snel, B., Huynen, M.A., & Dutilh B.E. (2005) Genome trees and the nature of genome evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 191–209.

Zuckerlandl, E. & Pauling, L. (1965) Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theor. Biol.* **8**, 357–366.

Многими эта работа рассматривается как основание направления молекулярной эволюции.

Вопросы и задачи

1. Абсолютная конфигурация цитруллина. Какую конфигурацию (D или L) имеет выделенный из арбуза цитруллин, формула которого приведена ниже? Поясните свой ответ.



2. Связь между кривой титрования и кислотно-основными свойствами глицина. Раствор глицина (100 мл, концентрация 0,1 М, рН 1,72) титровали 2 М раствором NaOH. В ходе титрования следили за изменениями рН и по результатам

измерений построили график (см. ниже). Ключевые точки на графике обозначены цифрами от I до V. Какие из этих точек следует *указать* в ответе на поставленные ниже вопросы? Поясните свой ответ.

а) Глицин преимущественно находится в форме ${}^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

б) *Средний* суммарный заряд молекул глицина $+\frac{1}{2}$.

в) Половина аминокрупп ионизована.

г) Значение рН равно значению pK_a карбоксильной группы.

д) Значение рН равно значению pK_a протонированной аминокруппы.

е) Глицин обладает максимальной буферной емкостью.

ж) Средний суммарный заряд молекул глицина равен нулю.

з) Карбоксильная группа полностью оттитрована (первая точка эквивалентности).

и) Глицин полностью оттитрован (вторая точка эквивалентности).

к) Глицин преимущественно находится в форме ${}^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$.

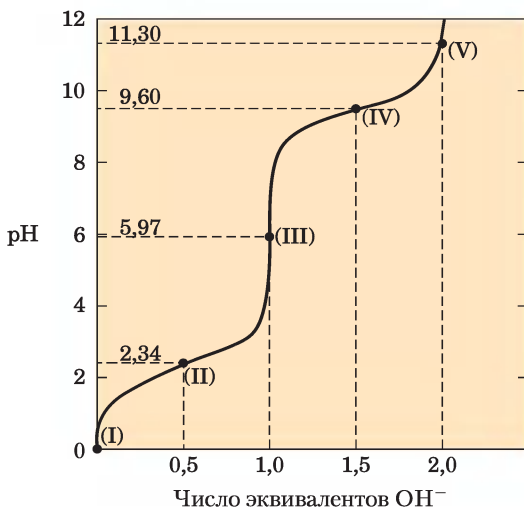
л) *Средний* суммарный заряд молекул глицина равен -1 .

м) Половина молекул глицина преимущественно находится в форме ${}^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, а половина — в форме ${}^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$.

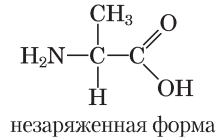
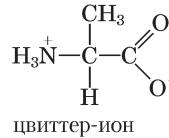
н) Какова изоэлектрическая точка глицина?

о) В какой точке титрование завершено?

п) Укажите области с *минимальной* буферной емкостью глицина.



3. Какую долю от всех молекул составляют полностью незаряженные формы аланина? При значении рН, совпадающем со значением изоэлектрической точки аланина, суммарный заряд молекулы равен нулю. Ниже представлены две структурные формулы, каждая из которых в целом не имеет заряда, однако преобладающей формой аланина при $pH = pI$ является цвиттер-ион.



а) Почему при $pH = pI$ аланин преимущественно находится в форме цвиттер-иона, а не незаряженной частицы?

б) Какая доля молекул аланина не несет заряда в изоэлектрической точке? Поясните свой ответ.

4. Состояние ионизации аминокислот. Каждая ионизируемая группа аминокислоты может находиться в одном из двух состояний — заряженном или нейтральном. Электрический заряд на функциональной группе определяется соотношением между значениями рН раствора и pK_a данной группы. Данное соотношение описывается уравнением Хендерсона–Хассельбаха.

а) Гистидин имеет три ионизируемые функциональные группы. Напишите уравнения для трех соответствующих процессов ионизации и укажите приблизительные значения pK_a для каждой реакции. Нарисуйте структуру гистидина во всех состояниях ионизации. Какой суммарный заряд несет молекула гистидина в каждом из этих состояний?

б) Нарисуйте ионные структуры гистидина, преобладающие при рН 1, 4, 8 и 12. Учтите, что состояние ионизации можно определить, рассматривая каждую ионизируемую группу независимо от остальных.

в) Каков суммарный заряд молекулы гистидина при рН 1, 4, 8 и 12? Куда будет двигаться молекула гистидина в электрическом поле при каждом из этих значений рН — к катоду (–) или к аноду (+)?

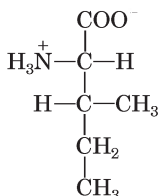
5. Разделение аминокислот методом ионообменной хроматографии. Анализ смеси аминокислот начинают с разделения этой смеси на компонен-

ты с помощью ионообменной хроматографии. После нанесения на колонку с катионообменной смолой, содержащей группы $-\text{SO}_3^-$ (рис. 3-17, а), аминокислоты движутся вниз по колонке с разной скоростью, поскольку на их движение оказывают влияние два фактора: 1) притяжение между $-\text{SO}_3^-$ группами носителя и положительно заряженными функциональными группами аминокислот; 2) гидрофобные взаимодействия между боковыми цепями аминокислот и сильно гидрофобной полистиреновой основой носителя. Для каждой из приведенных ниже пар аминокислот определите, какая аминокислота будет сходить с колонки первой при промывании колонки буфером с рН 7,0.

- а) Asp и Lys
- б) Arg и Met
- в) Glu и Val
- г) Gly и Leu
- д) Ser и Ala

6. Обозначение стереоизомеров изолейцина.

Структурная формула аминокислоты изолейцина изображена ниже.



- а) Сколько хиральных центров имеет молекула изолейцина?
- б) Сколько оптических изомеров может быть у изолейцина?
- в) Нарисуйте пространственные формулы для всех оптических изомеров изолейцина.

7. Сравнение значений pK_a аланина и полиаланина. Кривая титрования аминокислоты аланина отражает наличие двух ионизируемых функциональных групп с pK_a 2,34 и 9,69, что отвечает ионизации карбоксильной и протонированной аминогруппы соответственно. Кривые титрования ди-, три- и олигопептидов аланина также демонстрируют наличие только двух ионизируемых групп, хотя их экспериментально определенные значения pK_a отличаются от pK_a функциональных групп аланина (см. табл.).

Аминокислота или пептид	pK_1	pK_2
Ala	2,34	9,69
Ala-Ala	3,12	8,30
Ala-Ala-Ala	3,39	8,03
Ala-(Ala) $_n$ -Ala, $n \geq 4$	3,42	7,94

а) Нарисуйте структурную формулу Ala-Ala-Ala. Укажите функциональные группы в этой молекуле, которым соответствуют pK_1 и pK_2 .

б) Почему с добавлением каждого следующего остатка аланина значение pK_1 *возрастает*?

в) Почему с добавлением каждого следующего остатка аланина значение pK_2 *снижается*?

8. Размеры белков. Чему приблизительно равна молекулярная масса белка, состоящего из 682 аминокислотных остатков, соединенных в единственную полипептидную цепь?

9. Число остатков триптофана в бычьем сывороточном альбумине. Количественный анализ аминокислот показал, что бычий сывороточный альбумин (БСА) содержит 0,58% (по массе) триптофана ($M_r = 204$).

а) Рассчитайте *минимальную* молекулярную массу БСА (т. е. считайте, что в молекуле белка содержится только один остаток триптофана).

б) В соответствии с результатами гель-фильтрации молекулярная масса БСА равна 70 000. Сколько остатков триптофана содержится в его молекуле?

10. Субъединичный состав белка. По данным гель-фильтрации молекулярная масса белка составляет 400 кДа. В результате проведения электрофореза в геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) были обнаружены три полосы, соответствующие белкам с массой 180, 160 и 60 кДа. В присутствии SDS и дитиотрейтола также обнаружены три полосы, на этот раз соответствовавшие белкам с молекулярной массой 160, 90 и 60 кДа. Определите субъединичный состав белка.

11. Суммарный электрический заряд молекулы пептида. Пептид имеет последовательность Glu-His-Trp-Ser-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly.

а) Каков суммарный заряд этой молекулы при рН 3, 8 и 11? (Используйте значения pK_a для функциональных групп боковых цепей, а также концевых карбоксильной и аминогруппы, приведенные в табл. 3-1.)

б) Оцените значение pI этого пептида.

12. Изоэлектрическая точка пепсина. Пепсины называют группу пищеварительных ферментов, секретируемых в виде более крупных белков-предшественников железами желудка. Эти железы, кроме того, выделяют соляную кислоту, которая растворяет присутствующие в пище частицы и тем самым позволяет пепсину расщеплять отдельные молекулы белка ферментативным путем. Образовавшаяся смесь пепси, HCl и пищеварительных ферментов, известная как пищевая кашица или химус, имеет значение рН около 1,5. Каким должно быть значение pI пепсина? Какие функциональные группы должны содержаться в пепсине, чтобы обеспечивать ему такое значение pI ? Какие аминокислоты в белках содержат такие группы?

13. Изоэлектрическая точка гистонов. Гистоны — это белки, содержащиеся в ядре эукариотической клетки и прочно связанные с молекулами ДНК, которые богаты фосфатными группами. Значение pI гистонов очень высокое — около 10,8. Какие аминокислотные остатки должны в большом количестве содержаться в молекулах гистонов? Каким образом эти остатки обеспечивают прочное связывание гистонов с ДНК?

14. Растворимость полипептидов. Один из методов разделения полипептидов основан на различии в их растворимости. Растворимость крупных полипептидов в воде зависит от относительной полярности их R-групп, в частности от числа ионизируемых групп: чем больше ионизируемых групп имеет полипептид, тем легче он растворяется в воде. Какой полипептид из каждой приведенной ниже пары обладает лучшей растворимостью при указанном значении рН?

а) (Gly)₂₀ или (Glu)₂₀ при рН 7,0.

б) (Lys-Ala)₃ или (Phe-Met)₃ при рН 7,0.

в) (Ala-Ser-Gly)₅ или (Asn-Ser-His)₅ при рН 6,0,

г) (Ala-Asp-Gly)₅ или (Asn-Ser-His)₅ при рН 3,0.

15. Очистка фермента. Биохимик исследует и выделяет новый фермент. Результаты проведенной очистки сведены в таблицу.

Стадия очистки	Общий белок (мг)	Активность (единицы)
1. Грубый экстракт	20 000	4 000 000
2. Осаждение солями	5 000	3 000 000
3. Осаждение под действием рН	4 000	1 000 000
4. Ионообменная хроматография	200	800 000
5. Аффинная хроматография	50	750 000
6. Гель-фильтрация	45	675 000

а) Из приведенных в таблице данных рассчитайте удельную активность фермента после каждой стадии очистки.

б) Какая из стадий очистки была наиболее эффективной (т. е. позволила достичь наибольшего относительного увеличения чистоты)?

в) Какая из стадий была наименее эффективной?

г) Есть ли в приведенных данных какие-либо указания на то, что после стадии 6 белок полностью очищен? Что еще нужно сделать, чтобы оценить чистоту ферментативного препарата?

16. Диализ. Очищенный белок получен в буфере Нерес (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота)), рН 7, содержащем 500 мМ NaCl. Образец раствора белка (1 мл) помещают в диализный мешок и диализуют против 1 л того же буфера, но без NaCl. Небольшие молекулы и ионы (такие как Na⁺, Cl⁻ и Нерес) могут проходить сквозь мембрану, а белок не может.

а) Какова концентрация NaCl в образце белка после установления диализного равновесия? Считайте, что в процессе диализа объем раствора белка не изменяется.

б) Какой была бы концентрация соли в растворе белка, если бы тот же образец белка объемом 1 мл диализовали последовательно

дважды относительно 100 мл того же буфера Hepes?

17. Очистка пептида. Три пептида с указанным ниже аминокислотным составом смывают с колонки, заполненной катионообменной смолой, при pH 7,0. В каком порядке пептиды будут сходиться с колонки?

Пептид А: Ala 10%, Glu 5%, Ser 5%, Leu 10%, Arg 10%, His 5%, Ile 10%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 10%, Gly 10%, Pro 5% и Trp 10%.

Пептид В: Ala 5%, Val 5%, Gly 10%, Asp 5%, Leu 5%, Arg 5%, Ile 5%, Phe 5%, Tyr 5%, Lys 5%, Trp 5%, Ser 5%, Thr 5%, Glu 5%, Asn 5%, Pro 10%, Met 5% и Cys 5%.

Пептид С: Ala 10%, Glu 10%, Gly 5%, Leu 5%, Asp 10%, Arg 5%, Met 5%, Cys 5%, Tyr 5%, Phe 5%, His 5%, Val 5%, Pro 5%, Thr 5%, Ser 5%, Asn 5% и Gln 5%.

18. Определение последовательности пептида лейэнкефалина, выделенного из мозга. Из нормальной мозговой ткани была выделена группа пептидов, влияющих на передачу нервного импульса в некоторых отделах мозга. Эти пептиды называют опиоидами, поскольку они связываются со специфическими рецепторами, с которыми также связываются опиаты (алкалоиды опиума), такие как морфин и налоксон. Таким образом, опиоиды имитируют некоторые свойства опиатов. Некоторые ученые рассматривают эти вещества как содержащиеся в мозге собственные средства обезболивания. Используя приведенные ниже данные, определите аминокислотную последовательность опиоида лейэнкефалина. Объясните, как предложенная вами структура согласуется с каждым из результатов (а–в).

а) Полный гидролиз под действием 6 М HCl при 110 °C с последующим анализом аминокислот показал наличие в смеси Gly, Leu, Phe и Tyr в молярном соотношении 2:1:1:1.

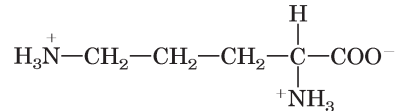
б) Хроматографический анализ, проведенный после обработки пептида 1-фтор-2,4-динитробензолом и полного гидролиза, выявил наличие 2,4-динитрофенильного производного тирозина. При этом свободного тирозина обнаружено не было.

в) Полное расщепление пептида под действием пепсина и проведенное затем хроматографическое разделение показали наличие

дипептида, содержащего остатки Phe и Leu, и трипептида, содержащего Tyr и Gly в соотношении 1:2.

19. Структура полипептидного антибиотика, выделенного из *Bacillus brevis*. Экстракты, полученные из бактериальной культуры *Bacillus brevis*, содержат пептид, обладающий свойствами антибиотика. Этот пептид образует комплексы с ионами металлов и, по-видимому, нарушает систему ионного транспорта через клеточную мембрану у других видов бактерий, что приводит к их гибели. Структуру пептида установили на основании приведенных ниже результатов.

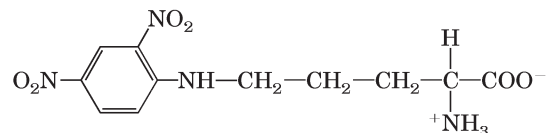
а) Полный кислотный гидролиз полипептида с последующим анализом аминокислот продемонстрировал наличие эквимольных количеств Leu, Orn, Phe, Pro и Val. Orn — это сокращенное обозначение аминокислоты орнитина, не встречающейся в белках, но присутствующей в некоторых пептидах. Орнитин имеет такую структурную формулу:



б) Молекулярная масса пептида оказалась приблизительно равна 1200.

в) Пептид не подвергался гидролизу при обработке ферментом карбоксипептидазой. Этот фермент катализирует отщепление любых С-концевых остатков, за исключением остатка Pro, а также за исключением тех случаев, когда остаток по какой-либо причине не содержит свободной карбоксильной группы.

г) Обработка исходного пептида 1-фтор-2,4-динитробензолом с последующим полным гидролизом и хроматографическим разделением показали наличие только свободных аминокислот и производного следующего строения:



(Подсказка. Учтите, что 2,4-динитрофенильная группа присоединена не как обычно к α -атому азота, а к аминогруппе боковой цепи.)

д) Частичный гидролиз пептида, хроматографическое разделение продуктов и их аминокислотный анализ выявили наличие ди- и трипептидов следующего строения (аминоконцевые остатки всегда расположены слева):

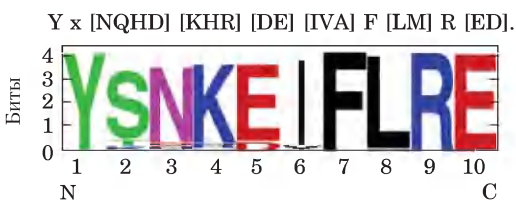
Leu–Phe Phe–Pro Orn–Leu Val–Orn,

Val–Orn–Leu Phe–Pro–Val Pro–Val–Orn.

Используя данную информацию, определите аминокислотную последовательность пептидного антибиотика. Поясните ваши рассуждения. Объясните, как предложенная вами структура *согласуется* со всеми экспериментальными данными.

20. Эффективность секвенирования пептидов. Пептид с первичной структурой Lys–Arg–Pro–Leu–Ile–Asp–Gly–Ala секвенировали по методу Эдмана. Каждая стадия цикла проведена с эффективностью 96%. Определите, какую часть всех аминокислот, высвобожденных в четвертом цикле, составляет лейцин? Каким будет это значение при эффективности каждого цикла 99%?

21. Сравнение последовательностей. Белки, называемые молекулярными шаперонами (см. гл. 4), участвуют в процессе укладки (фолдинга) белков. Белки одного класса шаперонов, обнаруженные в организмах от бактерий до млекопитающих, называют белками теплового шока 90 (Hsp90). Все шапероны Hsp90 содержат 10 характерных аминокислотных последовательностей, которые позволяют легко идентифицировать эти белки в базе данных. Два примера таких последовательностей представлены ниже.



а) Какая аминокислота в данной последовательности инвариантна (сохраняется во всех видах организмов)?

б) В какой позиции (каких позициях) располагаются только аминокислоты с положительно заряженными боковыми цепями? Для каждой из этих позиций определите, какая аминокислота встречается чаще других.

в) В какой позиции (каких позициях) располагаются только аминокислоты с отрицательно заряженными боковыми цепями? Для каждой из этих позиций определите, какая аминокислота встречается чаще других.

г) В какой позиции может находиться любая аминокислота (хотя одна аминокислота все же встречается намного чаще других)? Что это за позиция и какая аминокислота встречается здесь чаще остальных?

22. Биохимический протокол: ваша первая очистка белка. Придя впервые работать в биохимическую лабораторию, первые несколько недель вы учитесь мыть посуду и подписывать пробирки. Затем вам доверяют готовить буферные и запасные растворы, необходимые для различных лабораторных нужд. Наконец, вы берете на себя ответственность за очистку первого белка. Это цитратсинтаза — фермент цикла лимонной кислоты, локализованный в митохондриях. Вы выполняете все перечисленные ниже стадии, следуя известному протоколу очистки. Руководящий вами более опытный студент на каждой стадии очистки задает вопросы относительно смысла проведения этой стадии. Дайте ему ответы. (Подсказка: информацию об осмолярности см. в гл. 2; информацию о выделении клеточных органелл см. с. 23).

а) На ближайшей бойне вы получили 20 кг бычьих сердец. Вы перевозили их во льду и каждую стадию очистки также выполняли на льду или в холодной комнате. С помощью специального гомогенизатора вы гомогенизировали сердца при pH 7,2 в буфере, содержащем 0,2 М сахарозу. Почему в качестве исходного материала вы используете сердце быка и в таком большом количестве? Почему ткань нужно хранить на льду и разрушать при pH 7,2 в присутствии сахарозы? Что происходит с тканью при гомогенизации?

б) Вы подвергаете гомогенат ткани (плотный и непрозрачный) дифференциальному центрифугированию. Зачем вы это делаете?

в) Для дальнейших экспериментов вы берете супернатант, который в основном содержит интактные митохондрии. Далее вы подвергаете митохондрии осмотическому лизису. Лизат имеет меньшую плотность, чем гомогенат, но все еще непрозрачен. Он состоит из митохондриальных мембран и внутреннего содержимого митохондрий. К этому лизату вы добавляете хорошо растворимую соль — сульфат аммония — в определенной концентрации, центрифугируете свою смесь, декантируете супернатант и отбрасываете осадок. К супернатанту, который выглядит более прозрачным, чем лизат, вы добавляете следующую порцию сульфата аммония и вновь центрифугируете образец. Но на этот раз вы сохраняете осадок, поскольку в нем содержится интересующий вас белок. *Почему нужно добавлять соль дважды?*

г) Вы растворяете осадок, полученный при повторном осаждении сульфатом аммония, и проводите диализ в течение ночи против большого объема буфера с pH 7,2. *Почему диализный буфер не содержит сульфата аммония? Почему вы используете буфер, а не воду?*

д) Раствор после диализа вы наносите на колонку для гель-фильтрации. Следуя протоколу, отбираете первую сошедшую с колонки белковую фракцию и отбрасываете все остальные белки. Наличие белка во фракциях определяете по поглощению раствора в ультрафиолетовой области (при 280 нм). *Что означает тот факт, что ваш белок сходит с колонки первым? Почему поглощение при 280 нм является хорошим показателем наличия белка в растворе?*

е) Фракцию, отобранную при проведении предыдущей стадии, вы наносите на колонку для катионообменной хроматографии. Вы отбрасываете весь исходный раствор, сошедший с колонки, и начинаете промывать колонку раствором с более высоким значением pH. Первую вышедшую белковую фракцию отбираете. *Объясните свои действия.*

ж) Вы наносите образец из вашей фракции, которая теперь сильно уменьшилась в размере и выглядит практически прозрачной (возможно имеет розоватый оттенок), на гель для изоэлектрофокусирования. После проведения разделения и окрашивания геля вы видите на нем три широкие полосы. В соответствии с протоколом интересующий вас белок

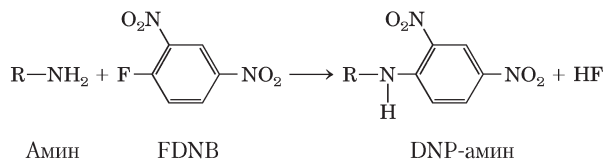
имеет значение pI 5,6. Но вы хотите подтвердить чистоту белка еще одним методом. Вы вырезаете из геля полосу с pI 5,6 и помещаете на полиакриламидный гель для проведения электрофореза в присутствии SDS. *Почему вы не уверены в чистоте белка, находящегося в отобранной вами полосе? Что вам могут сказать результаты SDS-электрофореза? Почему важно проводить SDS-электрофорез после изоэлектрофокусирования?*

Анализ экспериментальных данных —

23. Определение аминокислотной последовательности инсулина. На рис. 3-24 представлена аминокислотная последовательность гормона инсулина. Его структура была определена Фредериком Сенгером с сотрудниками. Большая часть этой работы опубликована в журнале *Biochemical Journal* в период с 1945 по 1955 г.

Когда Сенгер с сотрудниками начали этот цикл работ, было известно, что инсулин представляет собой небольшой белок, состоящий из двух или четырех полипептидных цепей, соединенных дисульфидными мостиками. Ученым удалось разработать несколько простых методов для изучения последовательности белка.

Обработка FDNB. FDNB (1-фтор-2,4-динитробензол) реагирует со свободными аминогруппами (но не с амидо- или гуанидиногруппами) белка, образуя динитрофенильные (DNP) производные аминокислот:



Кислотный гидролиз. Кипячение белка с 10%-й HCl на протяжении нескольких часов приводит к гидролизу всех пептидных и амидных связей. При краткой обработке образуются короткие пептиды; чем дольше обработка, тем полнее расщепление белка на составляющие его аминокислоты.

Окисление цистеина. При обработке белка надмуравьиной кислотой происходит расщепление всех дисульфидных связей, а все остатки

цистеина превращаются в остатки цистеиновой кислоты (рис. 3-26).

Бумажная хроматография. Эта наиболее примитивная версия тонкослойной хроматографии (см. рис. 10-24) предназначена для разделения веществ на основании различия их химических свойств и позволяет идентифицировать отдельные аминокислоты и, в некоторых случаях, дипептиды. Тонкослойная хроматография позволяет разделять пептиды более крупного размера.

В своей первой работе (1945 г.) Сенгер обработал инсулин FDNB, а затем подверг образовавшийся продукт гидролизу. Он обнаружил много свободных аминокислот, но лишь три DNP-производных: α -DNP-глицин (DNP присоединен к α -аминогруппе аминокислоты), α -DNP-фенилаланин и ϵ -DNP-лизин (DNP присоединен к ϵ -аминогруппе). Сенгер интерпретировал этот результат таким образом, что инсулин состоит из двух белковых цепей: одна имеет на N-конце Gly, а другая имеет на N-конце Phe. Одна из двух цепей, кроме того, содержит остаток Lys, но не на N-конце. Сенгер назвал цепь, начинающуюся с остатка Gly, цепью A, а цепь, начинающуюся с остатка Phe, цепью B.

а) Объясните, как Сенгер пришел к этим выводам.

б) Соответствуют ли данные результаты известной на сегодняшний день структуре инсулина (рис. 3-24)?

В более поздней статье (1949 г.) Сенгер описывал, как данный метод позволил ему определить несколько аминокислотных остатков в начале каждой цепи инсулина (с N-конца). Например, при анализе последовательности цепи B он проделал следующие шаги.

1. Окисление инсулина для разделения цепей A и B.
2. Приготовление чистого образца цепи B с помощью бумажной хроматографии.
3. Проведение реакции цепи B с FDNB.
4. Мягкий кислотный гидролиз продукта с целью получения нескольких коротких пептидов.

5. Разделение DNP-производных пептидов от пептидов, не содержащих DNP-групп.

6. Выделение четырех DNP-пептидов, названных B1, B2, B3 и B4.

7. Полный гидролиз каждого DNP-пептида с целью получения свободных аминокислот.

8. Идентификация продуктов гидролиза каждого пептида с помощью бумажной хроматографии.

Были получены следующие результаты:

B1: только α -DNP-фенилаланин;

B2: α -DNP-фенилаланин и валин;

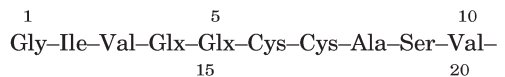
B3: аспарагиновая кислота, α -DNP-фенилаланин и валин;

B4: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, α -DNP-фенилаланин и валин

в) Основываясь на этих результатах, назовите четыре первые аминокислоты на N-конце пептида B. Объясните свои рассуждения.

г) Согласуются ли эти результаты с известной последовательностью инсулина (рис. 3-24)? Объясните все несоответствия.

Сенгер с коллегами использовали свой метод для определения полной последовательности цепей A и B. Они установили следующую последовательность A цепи (N-конец расположен слева):



Поскольку при кислотном гидролизе все остатки Asn превращаются в Asp, а все остатки Gln — в Glu, эти остатки пришлось обозначить Asx и Glx соответственно (точно их идентифицировать было невозможно). Сенгер решил эту проблему, разбив последовательности на короткие пептиды с помощью протеаз, расщепляющих пептидные связи, но не расщепляющих амидные связи в остатках Asn и Gln. Далее он определил число амидных групп в каждом пептиде, измеряя концентрацию NH_4^+ , выделяющегося при кислотном гидролизе пептида. Ниже представлены некоторые результаты, полученные для цепи A. Возможно, пептиды не были полностью свободны от примесей, так что эти цифры не абсолютно точные,

Название пептида	Последовательность аминокислот	Количество амидных групп в пептиде
Ac1	Cys-Asx	0,7
Ap15	Tyr-Glx-Leu	0,98
Ap14	Tyr-Glx-Leu-Glx	1,06
Ap3	Asx-Tyr-Cys-Asx	2,10
Ap1	Glx-Asx-Tyr-Cys-Asx	1,94
Ap5pa1	Gly-Ile-Val-Glx	0,15
Ap5	Gly-Ile-Val-Glx-Glx-Cys-Cys- Ala-Ser-Val-Cys-Ser-Leu	1,16

но достаточно точные для решения поставленной Сенгером задачи.

д) На основании этих данных определите аминокислотную последовательность цепи А. Объясните свой ответ и сравните его с данными, представленными на рис. 3-24.

Литература

Sanger, F. (1945) The free amino groups of insulin. *Biochem. J.* **39**, 507–515.

Sanger, F. (1949) The terminal peptides of insulin. *Biochem. J.* **45**, 563–574.

Возможно, наиболее замечательным свойством молекулы миоглобина является ее сложность и отсутствие симметрии. Ее структурная организация кажется начисто лишенной какой бы то ни было регулярности, которую инстинктивно ожидаешь найти, и оказывается гораздо более сложной, чем предсказывает любая структурная теория белка.

Джон Кендрю. Из статьи в журнале Nature, 1958

4

Трехмерная структура белков

4.1. Обзор белковых структур 172

4.2. Вторичная структура белка 177

4.3. Третичная и четвертичная структуры белка 184

4.4. Денатурация и фолдинг белка 208

Остов типичного белка обусловлен образованием сотен ковалентных связей. Вокруг многих из этих связей возможно свободное вращение, поэтому молекула белка может принимать бесчисленное множество различных конформаций. Однако каждый белок несет специфическую химическую или структурную функцию, для реализации которой необходимо, чтобы он имел строго определенную трехмерную структуру (рис. 4-1). В конце 1920-х гг. были получены кристаллы некоторых белков, в том числе гемоглобина ($M_r = 64\,500$) и фермента уреазы ($M_r = 483\,000$). Учитывая, что упорядоченное расположение молекул в кристалле обычно возможно лишь при идентичности этих молекул, кристаллическое состояние очень многих белков доказывает, что даже самые крупные белки состоят из дискретных химических единиц с определенной структурой. Этот вывод в свое время полностью изменил взгляд на белки и их функции.

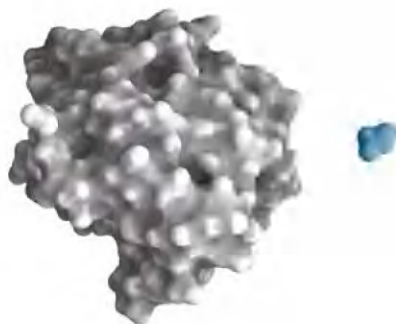


Рис. 4-1. Глобулярная структура химотрипсина. Чтобы дать представление о размерах, рядом (справа) с молекулой химотрипсина изображена молекула глицина. Известные трехмерные структуры белков хранятся в специальных банках данных (Protein Data Bank, PDB; см. доп. 4-4). Изображение взято из банка данных PDB (6GCH).

В данной главе мы обсудим, каким образом аминокислотная последовательность полипептидной цепи определяет трехмерную структуру белка. В связи с этим рассмотрим пять основных вопросов. Во-первых, трехмерная структура белка определяется его аминокислотной последовательностью. Во-вторых, функции белка зависят от его структуры. В-третьих, выделенный белок обычно существует в одной или нескольких стабильных структурных формах. В-четвертых, наиболее важный вклад в стабилизацию специфической структуры белка вносят не ковалентные, а

другие взаимодействия. Наконец, в-пятых, среди огромного числа уникальных белковых структур можно выделить некоторые общие типы, помогающие понять принципы архитектуры белковых молекул.

Вынося на обсуждение эти темы, мы вовсе не имели в виду, что у белков статичная, неизменная трехмерная структура. Работа белка часто связана с взаимными превращениями двух или нескольких его пространственных форм. Динамические аспекты структуры белка обсуждаются далее в гл. 5 и 6. Понимание всех уровней структурной организации белков необходимо для обсуждения их функций, к которому мы перейдем в следующих главах.

4.1. Обзор белковых структур

Пространственная организация атомов в молекуле белка называется **конформацией**. Конформации белка — это все структурные формы, которые он может принимать без разрыва ковалентных связей. Изменения конформации могут происходить, например, в результате относительного вращения групп при одинарных связях. Из всего теоретически возможного многообразия конформаций белка с сотнями одинарных связей в биологических системах в нормальных условиях реализуется лишь один или несколько вариантов. Существование всего нескольких устойчивых конформаций белковой молекулы отражает необходимость тех изменений, которые происходят с большинством белков при связывании с другими молекулами или в каталитических реакциях. Реализуемые конформации обычно наиболее термодинамически выгодные и характеризуются наименьшим значением свободной энергии Гиббса (G). Белок в любой из функциональных конформаций называется **нативным** белком.

Что определяет устойчивость той или иной конформации белка? К пониманию этого мы придем постепенно — от обсуждения первичной структуры белка (гл. 3) через последующее знакомство с вторичной, третичной и четвертичной структурами. Данный традиционный подход к изучению белка мы дополним новым материалом по классификации так называемых свехвторичных структур, образующихся при фолдинге белка. Начнем мы со знакомства с некоторыми основными принципами.

Конформация белка в значительной степени стабилизирована слабыми взаимодействиями

Если мы говорим о структуре белка, то **стабильность** (устойчивость) белка можно определить как его способность сохранять свою нативную конформацию. Нативные белки в физиологических условиях стабильны лишь условно, при переходе от свернутого к развернутому белку изменение энергии $\Delta G \leq 20\text{--}65$ кДж/моль. Любая полипептидная цепь теоретически может принимать бесчисленное число различных конформаций, в результате чего развернутый белок характеризуется высокой конформационной энтропией. Эта энтропия, а также водородные связи между многочисленными группами в полипептидной цепи и молекулами растворителя (воды) стремятся удержать белок в развернутом состоянии. Среди химических взаимодействий, противостоящих этим силам и стабилизирующих нативную конформацию, следует назвать дисульфидные связи и слабые (нековалентные) взаимодействия, описанные в гл. 2: водородные связи, гидрофобные и ионные взаимодействия.

Во многих белках дисульфидных мостиков нет. Условия внутри большинства клеток являются сильно восстановительными, что препятствует образованию связей $-S-S-$. У эукариот дисульфидные связи обнаруживаются в основном в секретируемых внеклеточных белках (например, в молекуле инсулина). В бактериальных белках дисульфидные связи также встречаются редко. Однако у термофильных бактерий и архей обычно много белков с дисульфидными связями, стабилизирующими эти белки; возможно, это один из способов адаптации к существованию в условиях повышенных температур.

У большинства организмов при формировании полипептидной цепью внутриклеточного белка вторичной и третичной структур особенно важны слабые межмолекулярные взаимодействия. Образование четвертичной структуры из нескольких полипептидов тоже зависит от слабых взаимодействий.

Для разрыва одинарной ковалентной связи требуется от 200 до 460 кДж/моль, в то время как для нарушения слабых взаимодействий достаточно 4—30 кДж/моль. Отдельные ковалентные связи, участвующие в поддержании нативной конформации белка, такие как дисульфидные

связи, удерживающие вместе части полипептидной цепи, очевидно, являются гораздо более прочными, чем отдельные слабые взаимодействия. Однако благодаря своей множественности именно слабые взаимодействия вносят основной вклад в стабилизацию структуры белка. Обычно конформация белка с самой низкой свободной энергией (т. е. наиболее устойчивая) отличается максимальным числом реализованных слабых взаимодействий.

Стабильность белка определяется не просто суммой свободных энергий образования многих слабых взаимодействий внутри него. Каждая группа, участвующая в образовании водородной связи в свернутом белке, до сворачивания белка была связана водородными связями (приблизительно такой же силы) с водой, но эти связи разорвались. Общий вклад конкретного слабого взаимодействия в стабильность белка, или *разность* свободных энергий свернутого и развернутого белка, примерно равен нулю. Стабилизирующими или дестабилизирующими могут быть также взаимодействия ионов. Таким образом, чтобы понять, чем объясняется предпочтительность нативной конформации белка, нужно учесть еще и другие факторы.

При рассмотрении вкладов слабых взаимодействий в стабильности белка мы обнаружим, что обычно среди них преобладают **гидрофобные взаимодействия**. Чистая вода представляет собой сеть связанных водородными связями молекул H_2O . Никакие другие молекулы не имеют таких возможностей для образования водородных связей, и любая другая молекула в водном растворе нарушает структуру водородных связей в воде. Любая гидрофобная молекула в водном растворе окружена структурированной оболочкой из молекул воды (**сольватной оболочкой**), возникающей в результате оптимальной организации водородных связей (см. рис. 2-7). Возрастание упорядоченности молекул воды в сольватной оболочке характеризуется неблагоприятным с термодинамической точки зрения понижением энтропии. Однако, если неполярные группы растворенного вещества собираются вместе и образуют кластеры, то размеры сольватной оболочки уменьшаются, поскольку в таком случае уже не вся поверхность неполярной группы экспонирована в раствор. Термодинамический результат этого — увеличение энтропии. Как было

показано в гл. 2, энтропия является главной движущей силой, заставляющей гидрофобные группы ассоциировать в водном растворе. Таким образом, гидрофобные боковые цепи аминокислот склонны образовывать кластеры внутри молекулы белка, чтобы держаться подальше от воды.

В физиологических условиях образование водородных связей и ионные взаимодействия в основном являются результатом проявления все того же энтропийного фактора. Полярные группы обычно способны образовывать водородные связи с водой, т. е. обуславливают растворимость в воде. Однако число водородных связей на единицу массы в чистой воде гораздо выше, чем в любой другой жидкости или растворе, поэтому существует предел растворимости даже самых полярных молекул, поскольку их присутствие уменьшает число водородных связей на единицу массы раствора. Следовательно, даже вокруг полярных молекул образуется некая сольватная оболочка из структурированных молекул воды. Даже если в макромолекуле энергия образования внутримолекулярных водородных связей или ионных взаимодействий между двумя полярными группами в значительной степени нивелируется нарушением подобных взаимодействий между теми же группами и водой, высвобождение структурированных молекул воды при возникновении внутримолекулярных связей является движущей силой, которая способствует фолдингу. Итак, наибольшая доля выигрыша в свободной энергии, обусловленного слабыми взаимодействиями внутри белка, в водном растворе связана с ростом энтропии за счет исчезновения гидрофобных поверхностей. Этого выигрыша достаточно, чтобы компенсировать потери конформационной энтропии, связанные с принятием белком одной-единственной конформации.

Очевидно, что гидрофобные взаимодействия чрезвычайно важны для стабилизации определенной конформации, обычно характеризующейся наличием внутри свернутой молекулы белка плотноупакованного гидрофобного ядра, состоящего из боковых цепей аминокислот. Очень важно также, чтобы все полярные или заряженные группы внутри молекулы белка имели подходящих партнеров для образования водородных связей и ионных взаимодействий. Одна водородная связь не вносит большого вклада в стабильность нативной структуры, однако наличие в гидрофобном

ядре полярной или заряженной группы, не имеющей партнера, может оказывать настолько сильное *дестабилизирующее* влияние, что подобная конформация может оказаться несостоятельной с термодинамической точки зрения. Выигрыш в свободной энергии, связанный с образованием пары между подобной группой и другой группой или молекулой в растворе, может превысить разницу между значениями свободных энергий свернутого и развернутого белка. Кроме того, образование водородных связей между функциональными группами белка в регулярных вторичных структурах является кооперативным процессом (т. е. образование одной связи повышает вероятность образования следующей связи), как это показано ниже. Таким образом, водородные связи часто вносят важный вклад в процесс укладки белка.

Стабилизировать нативную конформацию некоторых белков могут также взаимодействия между противоположно заряженными группами, образующими ионные пары (солевые мостики). Как и в случае водородных связей, в развернутой молекуле белка заряженные боковые цепи аминокислот взаимодействуют с водой и с солями, так что прекращение этих взаимодействий следует учитывать при оценке вклада солевых мостиков в стабильность упакованного белка. Однако прочность солевых мостиков возрастает при переходе к средам с меньшей диэлектрической проницаемостью (см. с. 77): от полярных водных сред (ϵ около 80) к неполярной среде внутри белка (ϵ около 4). Таким образом, солевые мостики, особенно те, что частично или полностью скрыты, могут играть важную роль в стабилизации структуры белка. Этот факт объясняет большое распространение скрытых солевых мостиков в белках термофильных организмов. Ионные взаимодействия также ограничивают подвижность белковой структуры и придают ей определенную уникальность, которую неспецифические гидрофобные взаимодействия обеспечить не могут.

Большинство типов белковых структур, обсуждаемых в данной главе, демонстрируют два простых правила: 1) гидрофобные аминокислотные остатки в значительной степени убраны внутрь молекулы белка для минимизации контакта с водой; 2) в молекуле белка реализуется максимальное число водородных связей. Нерастворимые и мембраносвязанные белки (которые

являются предметом обсуждения в гл. 11) подчиняются несколько другим правилам, что связано с их функциями и их окружением, но и на их структуру слабые взаимодействия оказывают решающее влияние.

Пептидные связи обладают жесткостью и плоской конфигурацией

Архитектура белка — первичная структура. Число возможных конформаций полипептида ограничивают также ковалентные связи. В конце 1930-х гг. Лайнус Полинг и Роберт Кори предприняли серию исследований, на основе которых сформировались наши нынешние представления о структуре белка. Они начали с тщательного изучения строения пептидной связи.



Лайнус Полинг, 1901–1994



Роберт Кори, 1897–1971

Известно, что между α -атомами двух соседних аминокислот находятся три ковалентные связи, которые расположены в следующем порядке: $C_\alpha - C - N - C_\alpha$. Исследования кристаллов аминокислот и дипептидов методом рентгеноструктурного анализа показали, что пептидная связь $C - N$ несколько короче, чем связь $C - N$ в простых аминах, и что атомы, участвующие в образовании пептидной связи, копланарны (т. е. лежат в одной плоскости). Это означает наличие резонанса или частичного обобществления двух пар электронов между карбонильным кислородом и амидным азотом (рис. 4-2, а). Кислород имеет частичный отрицательный заряд, а азот — частичный положительный заряд, в результате чего возникает слабый электрический диполь. Шесть атомов, участвующих в образовании **пептидной группы**, лежат в одной плоскости, причём атом кислорода карбониль-

ной группы и атом водорода амидной группы находятся в *транс*-положении друг к другу. На основании этих данных Полинг и Кори сделали вывод, что пептидная связь C—N не допускает свободного вращения, поскольку частично носит характер двойной связи. Вращение возможно толь-

ко вокруг связей C_α—C и N—C_α. Таким образом, остов полипептидной цепи можно изобразить как ряд жестких поверхностей, способных вращаться относительно атомов C_α (рис. 4-2, б). Жесткость пептидной связи ограничивает число конформаций, которые принимает пептидная цепь.

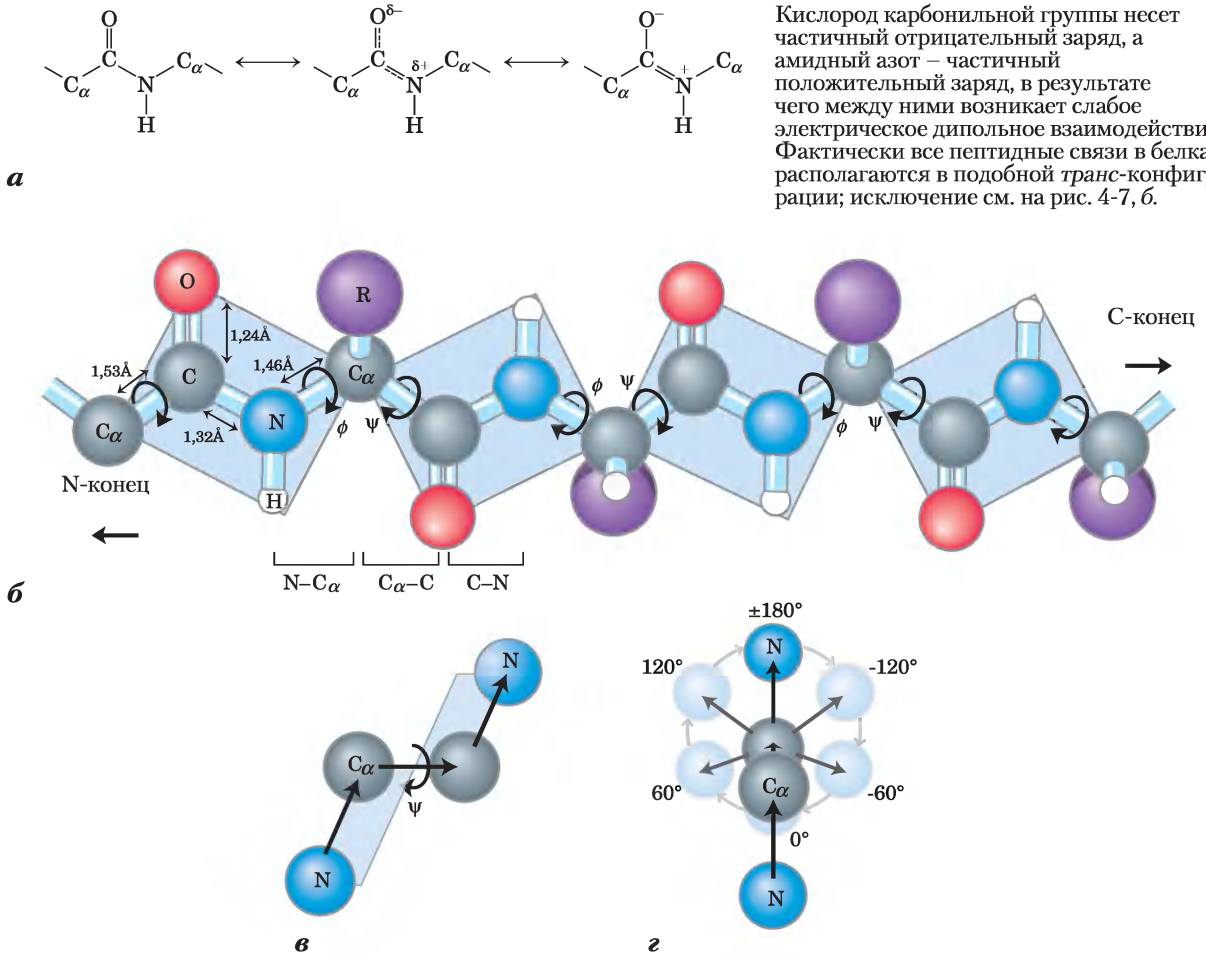


Рис. 4-2. Плоская структура пептидной связи. а) Каждая пептидная связь из-за наличия резонанса до некоторой степени имеет характер двойной связи, и поэтому вращения вокруг нее не происходит. б) В полипептидной цепи между соседними α-атомами находятся три связи. Пептидная связь N—C не допускает свободного вращения. Связи N—C_α и C_α—C допускают повороты; углы поворота обозначают буквами φ и ψ соответственно. Вращение вокруг других одинарных связей может быть затруднено из-за большого размера или заряда R-группы. в) Атомы и плоскости, определяющие угол ψ. г) По договоренности, углы φ и ψ составляют 180° (или -180°), когда первый и четвертый атомы максимально удалены друг от друга, а пептидная цепь полностью растянута. Если смотреть (в любом направлении) вдоль связи, претерпевающей вращение, углы φ и ψ возрастают в том случае, когда четвертый атом поворачивается по часовой стрелке по отношению к первому атому. В белке некоторые изображенные здесь конформации (например, угол 0°) являются запрещенными из-за перекрытия атомов. На рисунках б)–г) не соблюдается масштаб, и шарики, изображающие атомы, имеют меньший размер, чем их ван-дер-ваальсовы радиусы.

Конформационные изменения в белках описывают с помощью трех торсионных, или двугранных, углов ϕ (фи), ψ (пси) и ω (омега), которые описывают вращение вокруг каждой из трех повторяющихся связей в пептидном остове. Торсионный угол образуется двумя плоскостями. В случае пептидов эти плоскости определяются направлениями связей в пептидном остове. Две последовательные связи задают плоскость. Три последовательно расположенные связи — уже две плоскости (центральная связь принадлежит обеим плоскостям; см. рис. 4-2, *в*), а угол между этими плоскостями как раз и описывает конформацию белка.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Важные торсионные углы в пептиде обусловлены наличием трех векторов, соединяющих четыре последовательных атома пептидного остова (рис. 4-2, *в*): угол ϕ обусловлен связями $C-N-C_\alpha-C$ (вращение возможно вокруг связи $N-C_\alpha$), угол ψ — связями $N-C-C_\alpha-N$. Оба угла составляют $\pm 180^\circ$ в том случае, когда пептидная цепь полностью растянута, при этом все атомы пептидной группы лежат в одной плоскости (рис. 4-2, *з*). Посмотрим на рис. 4-2, *в*, для центральной связи показаны вектор связи и угол ψ . Величина торсионного угла ϕ будет возрастать при повороте четвертого (дальнего) атома по часовой стрелке (рис. 4-2, *з*). Торсионный угол может возрастать от -180° до 0° , причем и в том и в другом положениях первый и четвертый атомы заслоняют друг друга. При дальнейшем вращении от 0° до $+180^\circ$ (то же положение, что и при -180°) положение атомов возвращается к исходному. Третий торсионный угол ω рассматривают не всегда. Он образуется связями $C_\alpha-C-N-C_\alpha$. В данном случае в центре находится пептидная связь, вращение которой ограничено. Пептидная связь обычно (99,6% времени) находится в *транс*-конфигурации, при этом угол ω принимает значение $\pm 180^\circ$. В редких случаях *цис*-конфигурации пептидной связи $\omega = 0^\circ$ ■.

В принципе, углы ϕ и ψ могут иметь любые значения от -180° до $+180^\circ$, однако многие состояния являются запрещенными из-за стерических ограничений, вызванных влиянием атомов боковых цепей аминокислот. Так, например, по этой причине не реализуется конформация, при

которой величины обоих углов ϕ и ψ равны 0° (рис. 4-2, *в*). Данная конформация используется исключительно как нулевая точка для углов при повороте группы. Возможные значения углов ϕ и ψ можно найти из графика зависимости ψ от ϕ по так называемой **карте Рамачандрана** (рис. 4-3), предложенной Г. Н. Рамачандраном.

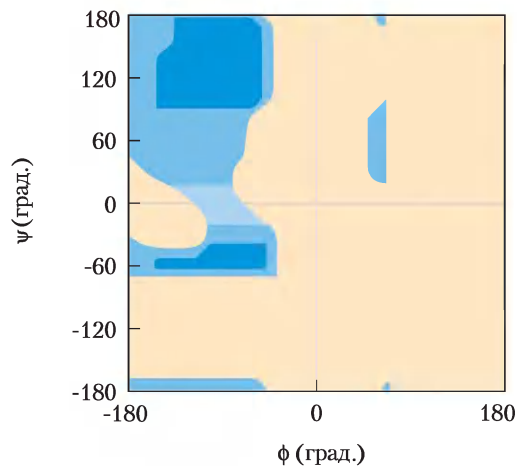


Рис. 4-3. Карта Рамачандрана для остатка L-Ala. Конформация пептида описывается величинами углов ϕ и ψ . Реализуются те конформации, при которых не наблюдается значительных стерических затруднений, что рассчитывается на основании известных ван-дер-ваальсовых радиусов атомов и углов поворота связей. Темно-синий цвет соответствует тем конформациям, в которых не наблюдается стерических затруднений и которые, следовательно, являются полностью разрешенными. Более светлый синий цвет соответствует конформациям, возможным в случаях неблагоприятных межатомных контактов. Самый светлый голубой цвет соответствует конформациям, которые возникают при изменении углов связей. Желтый цвет соответствует запрещенным конформациям. Диаграмма не симметрична; это результат L-стереоизомерии аминокислотных остатков. Графики для других L-аминокислотных остатков с неразветвленными боковыми цепями выглядят очень похожим образом. Реализуемый диапазон углов связей для аминокислот с разветвленными боковыми цепями (Val, Ile, Thr) чуть уже, чем в случае Ala. Напротив, диапазон разрешенных конформаций остатка глицина, имеющего наименьшие стерические ограничения, гораздо шире. Диапазон разрешенных конформаций Про сильно ограничен, поскольку значения ϕ лежат в пределах от -35° до -85° ; это связано с тем, что боковые цепи содержат циклы.

Краткое содержание раздела 4.1

ОБЗОР БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

- Каждый белок имеет определенную трехмерную структуру, связанную с его функцией.
- Пространственная структура белка стабилизирована множеством слабых взаимодействий. Основной вклад в стабилизацию глобулярной структуры большинства растворимых белков вносят гидрофобные взаимодействия. Термодинамически наиболее устойчивые структуры характеризуются оптимальной организацией водородных связей и ионных взаимодействий.
- Природа ковалентных связей в полипептидной цепи накладывает ограничения на структуру белка. Пептидная связь частично имеет характер двойной связи, в результате чего шесть атомов пептидной группы жестко зафиксированы в одной плоскости. Связи N—C_α и C—C_α допускают определенное вращение; соответствующие углы поворота обозначают греческими буквами φ и ψ.


4.2. Вторичная структура белка

Термин **вторичная структура** может относиться к любому выбранному фрагменту полипептидной цепи и описывает локальную пространственную укладку атомов, составляющих основную цепь, без учета конформации боковых цепей или их взаимодействия с другими фрагментами. *Регулярная* вторичная структура имеет место тогда, когда величины обоих торсионных углов (φ и ψ) остаются постоянными или почти постоянными на протяжении определенного участка цепи.

Наиболее известными типами вторичной структуры являются α-спирали и β-слои; также довольно часто встречаются β-повороты. Если регулярных структур не обнаружено, говорят о неопределенности вторичной структуры или о случайной спирали. Однако это последнее определение не дает правильного представления о структуре таких участков. Укладка полипептидного остова практически в любом белке не является случайной; более того, обычно она неизменна и

специфична для структуры и функционирования конкретного белка. Здесь мы сосредоточимся на рассмотрении наиболее часто встречающихся регулярных структур.

α-Спираль — это распространенный вид вторичной структуры белка

 **Архитектура** белка — α-спираль. Полинг и Кори знали о важном значении водородных связей для ориентирования полярных групп, таких как C=O и N—H, в составе пептидной группы. Кроме того, они знали о результатах работы Уильяма Астбери, который в 1930-х гг. впервые осуществил рентгеноструктурный анализ белков. Астбери показал, что фибриллярный белок α-кератин, составляющий основу волос и игл дикобраза, имеет регулярную структуру, а именно состоит из повторяющихся единиц размером 5,15–5,20 Å. (Размерность единицы длины ангстрем (Å) введена в честь шведского физика Андерса Йонеса Ангстрема; 1 Å = 0,1 нм. Эта единица не входит в систему СИ, но очень широко используется в структурной химии и биологии при описании размеров атомов и межатомных расстояний.) Владея данной информацией и собственными данными о строении пептидной связи, а также используя точно сконструированные модели, Полинг и Кори взялись за определение вероятных конформаций белковых молекул.

Самым простым способом организации полипептидной цепи с ее жесткой пептидной связью и остальными связями, способными к вращению, является спиральная структура, которую Полинг и Кори назвали **α-спиралью** (рис. 4-4). В этой структуре полипептидный остов образует плотные витки вокруг длинной оси молекулы, причем R-группы аминокислотных остатков выступают из спирального остова наружу. Периодически повторяющаяся единица соответствует одному витку спирали, шаг которой составляет приблизительно 5,4 Å, что лишь ненамного больше значения, определенного Астбери при рентгеноструктурном анализе кератина волос. Аминокислотные остатки в α-спирали имеют значения углов φ = -57° и ψ = -47°, причем каждый виток спирали содержит 3,6 аминокислотных остатка. В α-спиральных участках белков часто наблюдается некоторое отклонение от этих значений торсионных углов, причем вариации возможны даже внутри самого

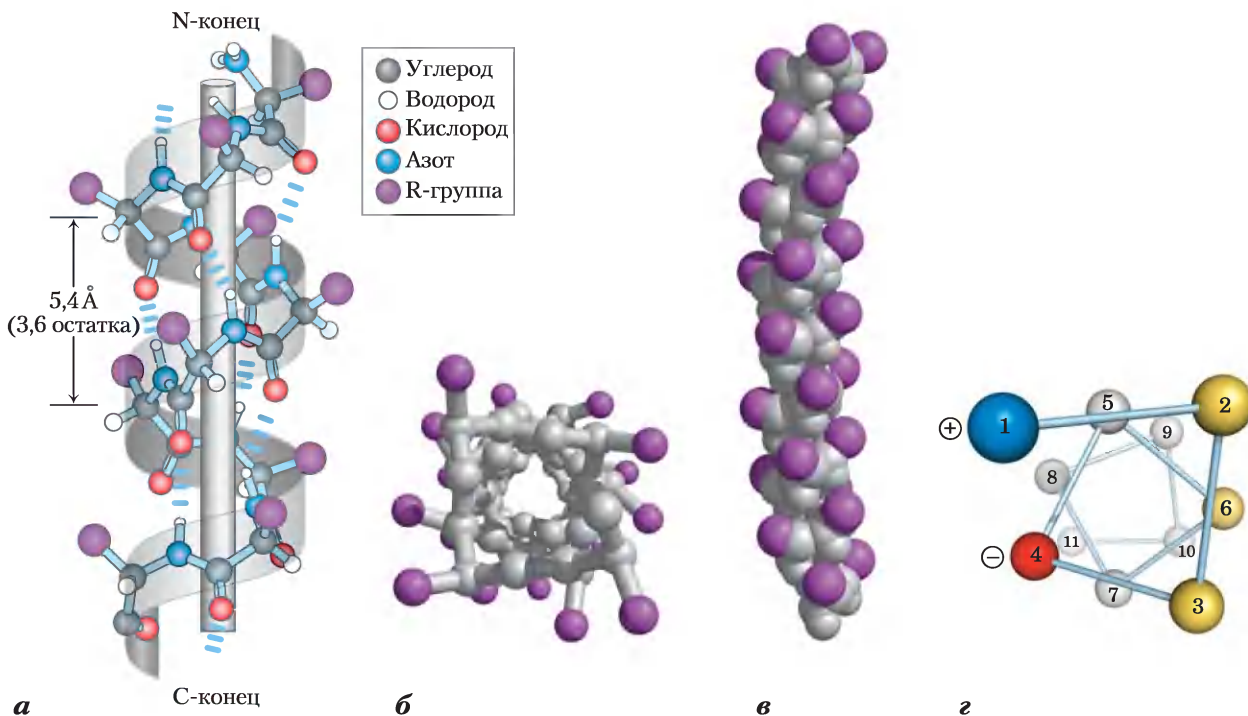


Рис. 4-4. Модели α -спирали, демонстрирующие различные аспекты ее структуры. а) Шаростержневая модель правой α -спирали, на которой показаны водородные связи внутри цепи. Шаг спирали составляет 3,6 аминокислотных остатков. б) Вид на α -спираль с одного ее конца вдоль длинной оси (PDB ID 4TNC). Обратите внимание на расположение R-групп, изображенных здесь лиловым цветом. При взгляде на эту шаростержневую модель создается ложное впечатление, что спираль внутри пустая, но дело в том, что размер шариков здесь не соответствует ван-дер-ваальсовым радиусам атомов. в) Как видно на шаровой модели, в центре α -спирали атомы очень плотно упакованы. г) Проекция спирали. Цветом выделены поверхности, обладающие теми или иными свойствами. Например, желтым цветом изображены гидрофобные остатки, которые располагаются на границе данной спирали и другой части этого же или другого полипептида. Красные и синие остатки иллюстрируют возможное взаимодействие между положительно и отрицательно заряженными группами боковых цепей, разделенных двумя остатками в спирали.

участка, что позволяет спирали образовывать небольшие изгибы и петли. Во всех белках α -спираль закручена вправо (доп. 4-1). Выяснилось, что α -спираль является преобладающей структурой в α -кератинах. Более того, около четверти всех аминокислотных остатков в полипептидных цепях входят в состав α -спиралей (в разных белках это значение несколько различается).

Почему α -спираль образуется чаще других возможных структур? До некоторой степени это объясняется тем, что в α -спирали оптимальным образом используются водородные связи внутри молекулы. Данная структура стабилизируется водородными связями между атомом водорода,

соединенным с электроотрицательным атомом азота пептидной связи, и электроотрицательным атомом кислорода карбонильной группы четвертой аминокислоты (считая вдоль цепи назад) (рис. 4-4, а). В образовании подобных водородных связей участвует каждая пептидная группа α -спирали (за исключением концевых групп). В результате каждый последующий виток связан с предыдущим тремя или четырьмя водородными связями, что делает эту конформацию полипептидной цепи довольно устойчивой.

В последующих модельных экспериментах было показано, что α -спираль может образовываться как из L-, так и из D-аминокислот, но

Дополнение 4–1 МЕТОДЫ Как отличить правую спираль от левой?

Существует простой метод, позволяющий различить правую и левую спирали. Сначала прижмите четыре пальца каждой руки к ладоням, а большие пальцы оставьте свободными и направьте их строго вверх (см. рисунок). Теперь посмотрите на свою правую руку и представьте, что четыре пальца обвивают большой палец в виде спирали, направленной туда, куда он показывает (т. е. против часовой стрелки). Это правая спираль. С левой рукой то же самое: четыре пальца образуют участок левой спирали, обвивающей большой палец и направленной вверх (т. е. по часовой стрелке).



все остатки должны представлять собой стереоизомеры одного и того же ряда; D-аминокислота нарушала бы регулярную структуру, состоящую из L-аминокислот, и наоборот. В принципе, существующие в природе L-аминокислоты могут образовывать как правую, так и левую спираль, однако протяженные левозакрученные спирали в белках не обнаружены.

Пример 4-1

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА И РАЗМЕРЫ БЕЛКОВ

Какова длина полипептида, состоящего из 80 аминокислотных остатков, образующих единственную α -спираль?

Решение. Виток идеальной α -спирали образован 3,6 аминокислотными остатками, что составляет в длину 5,4 Å. Таким образом, вклад каждого аминокислотного остатка в длину спирали составляет 1,5 Å. Получаем, что длина полипептидной цепи равна: $80 \text{ остатков} \cdot 1,5 \text{ Å/остаток} = 120 \text{ Å}$.

Последовательность аминокислот влияет на стабильность α -спирали

Не все полипептиды способны образовывать устойчивую α -спираль. Каждый аминокислотный остаток в полипептидной цепи обладает более или менее выраженной склонностью к образованию

α -спирали (табл. 4-1), связанной со свойствами R-группы и способностью соседних атомов основной цепи создавать необходимые значения углов ϕ и ψ . В большинстве экспериментальных модельных систем наибольшую склонность к образованию α -спиралей демонстрирует аланин.

Таблица 4-1

Склонность аминокислот принимать конформацию α -спирали

Аминокислота	$\Delta\Delta G^\circ$ (кДж/моль)*	Аминокислота	$\Delta\Delta G^\circ$ (кДж/моль)*
Ala	0	Leu	0,79
Arg	0,3	Lys	0,63
Asn	3	Met	0,88
Asp	2,5	Phe	2,0
Cys	3	Pro	4
Gln	1,3	Ser	2,2
Glu	1,4	Thr	2,4
Gly	4,6	Tyr	2,0
His	2,6	Trp	2,0
Ile	1,4	Val	2,1

Источник: данные (кроме данных по пролину) из статьи Bryson, J.W., Betz, S.F., Lu, H.S., Suich, D.J., Zhou, H.X., O'Neil, K.T., & DeGrado, W.F. (1995) Protein design: a hierarchic approach. *Science* **270**, 935. Данные по пролину из статьи Myers, J.K., Pace, C.N., & Scholtz, J.M. (1997) Helix propensities are identical in proteins and peptides. *Biochemistry* **36**, 10926.

* $\Delta\Delta G^\circ$ — изменение свободной энергии при принятии аминокислотным остатком α -спиральной укладки по сравнению с таковым для аланина.

Важную роль играет также положение аминокислотного остатка по отношению к его окружению. Взаимодействия между боковыми цепями аминокислотных остатков могут как стабилизировать, так и дестабилизировать эту структуру. Например, если в полипептидной цепи имеется протяженный участок, содержащий остатки глутаминовой кислоты, то при pH 7,0 такой участок не может укладываться в α -спираль. Дело в том, что отрицательно заряженные карбоксильные группы соседних остатков Glu отталкиваются настолько сильно, что мешают образованию спирали. По той же причине участки с близко расположенными остатками Lys и (или) Arg, R-группы которых при pH 7,0 несут положительный заряд, отталкиваются и препятствуют образованию спирали. Расположенные по соседству остатки Asn, Ser, Thr и Cys тоже могут дестабилизировать α -спираль; в данном случае причина заключается в больших размерах и форме их R-групп.

Виток α -спирали обеспечивает взаимодействие между боковой цепью одной аминокислоты и боковой цепью другой аминокислоты, расположенной от первой на расстоянии трех или четырех остатков (рис. 4-4, з). Часто положительно заряженные аминокислоты располагаются на расстоянии трех остатков от отрицательно заряженных, что способствует образованию ионной пары. Две ароматические аминокислоты часто расположены в пространстве одинаковым образом, что обеспечивает возможность гидрофобных взаимодействий.

Еще одним препятствием для образования α -спирали является присутствие остатков Pro или Gly, которые менее всего склонны образовывать α -спираль. В пролине атом азота входит в состав жесткого кольца (рис. 4-7, б), что исключает возможность вращения вокруг связи N–C $_{\alpha}$. В результате остатки Pro вносят в α -спирали дестабилизирующие петли. Кроме того, при атоме азота в остатке Pro нет атома водорода, который мог бы участвовать в образовании водородной связи с другим аминокислотным остатком. В связи с этим пролин крайне редко встречается в последовательностях, организованных в виде α -спирали. Глицин редко встречается в α -спиралях по другой причине: у него больше конформационных возможностей, чем у других аминокислотных остатков, поэтому полимеры

глицина образуют спиралевидные структуры, отличающиеся от α -спиралей.

Наконец, для устойчивости α -спиральной структуры полипептида важно, какие именно аминокислотные остатки расположены на концах витков спирали. Каждая пептидная связь представляет собой небольшой электрический диполь (рис. 4-2, а). Диполи связаны водородными связями, возникающими в спирали, в результате чего вся структура тоже представляет собой диполь, причем его величина возрастает с увеличением длины спирали (рис. 4-5). Четыре аминокислоты на каждом конце спирали не полностью вовлечены в образование водородных связей. Частичный положительный и частичный отрицательный заряды диполя обычно локализованы на пептидной аминогруппе и карбонильной группе вблизи N- и C-концов



Рис. 4-5. Диполь α -спирали. Электрический диполь, который существует на каждой пептидной связи (см. рис. 4-2, а), по водородным связям распространяется на всю длину α -спирального участка. На рисунке аминокислотные группы и карбонильные группы каждой пептидной связи обозначены знаками + и – соответственно. N- и C-концевые амино- и карбонильные остатки пептидных групп, не задействованные полностью в образовании водородных связей, показаны красным цветом.

спирали соответственно. По этой причине на N-конце спирального участка часто обнаруживают отрицательно заряженные аминокислоты, способные нейтрализовать положительный заряд диполя. Наличие положительно заряженных аминокислот на этом конце будет оказывать дестабилизирующее действие. Все сказанное выше верно и для C-конца спирали, но знаки зарядов противоположные.

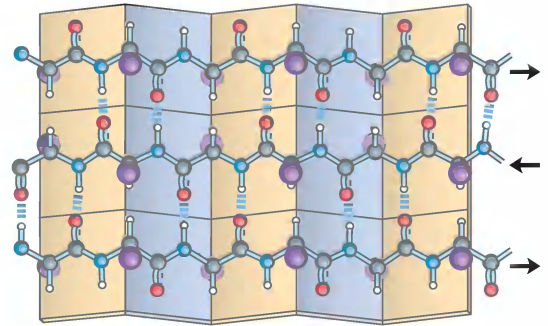
Итак, на устойчивость α -спирали влияют пять факторов: 1) склонность аминокислотных остатков образовывать α -спираль; 2) взаимодействия между R-группами, особенно между находящимися на расстоянии трех (или четырех) аминокислотных остатков; 3) близкое расположение аминокислотных остатков с R-группами большого размера; 4) наличие остатков Gly и Pro; 5) взаимодействие между аминокислотными остатками на N- и C-концах спирального участка и электрическим диполем, возникающем в спирали. Таким образом, способность конкретного участка полипептидной цепи образовывать α -спираль зависит от того, какие аминокислоты и в каком порядке расположены на этом участке.

Участки полипептидных цепей с β -конформацией образуют β -слой

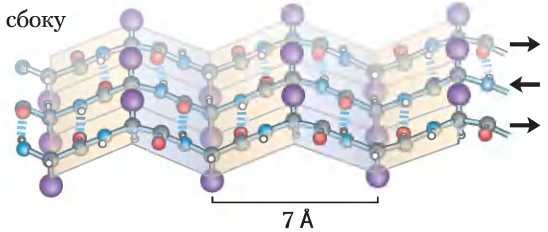
Архитектура белка – β -слой. В 1951 г. Полинг и Кори предсказали также существование второго типа регулярной организации пептидов – **β -структуры**, при которой цепи находятся в более вытянутой конформации, что подтверждается данными рентгеноструктурного анализа. В данном случае остов полипептидной цепи образует не спиральную, а зигзагообразную структуру (рис. 4-6). Зигзагообразные полипептидные цепи могут быть уложены параллельно, образуя ряд складок. В данной структуре, называемой β -слоем, водородные связи возникают между соседними участками полипептидных цепей. Обычно в образовании β -слоев участвуют фрагменты, расположенные в полипептидной цепи поблизости друг от друга, но иногда это могут быть сравнительно удаленные участки и даже участки разных полипептидных цепей. R-группы аминокислот выступают по обе стороны этой складчатой структуры, что хорошо видно на боковой проекции (рис. 4-6).

Антипараллельный β -слой

Вид сверху



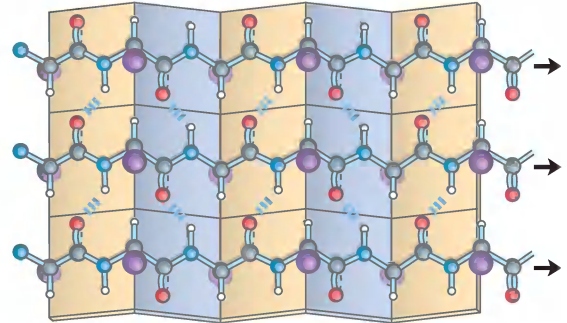
Вид сбоку



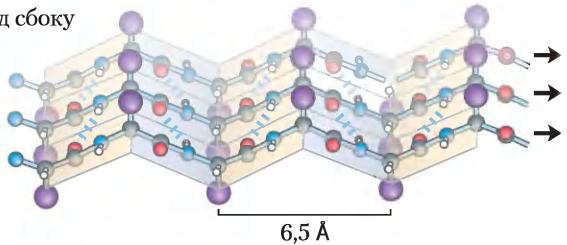
a

Параллельный β -слой

Вид сверху



Вид сбоку



б


Рис. 4-6. β -Конформация полипептидной цепи. Видно, что R-группы выступают из плоскости β -слоя, который называют иначе β -складчатым листом. Водородные связи между соседними слоями изображены в виде коротких синих черточек. Ориентация N- и C-концов соседних цепей (показана стрелками) может быть одинаковой или противоположной, образуя **a**) антипараллельный β -слой или **б**) параллельный β -слой.

Прилегающие друг к другу в β -слоях полипептидные цепи могут быть как параллельными, так и антипараллельными (т. е. иметь одну и ту же или разную ориентацию С- и N-концов полипептидной цепи). Возникающие при этом структуры довольно похожи, но несколько различаются по размеру повторяющегося звена (6,5 Å параллельные и 7,0 Å — антипараллельные цепи), и водородные связи в них организованы по-разному. В идеальных структурах значения углов составляют: $\phi = -119^\circ$, $\psi = +113^\circ$ (параллельная укладка) и $\phi = -139^\circ$, $\psi = +135^\circ$ (антипараллельная укладка); в реальных белках эти значения несколько отличаются, что приводит к вариациям структуры, как было показано выше для α -спирали.

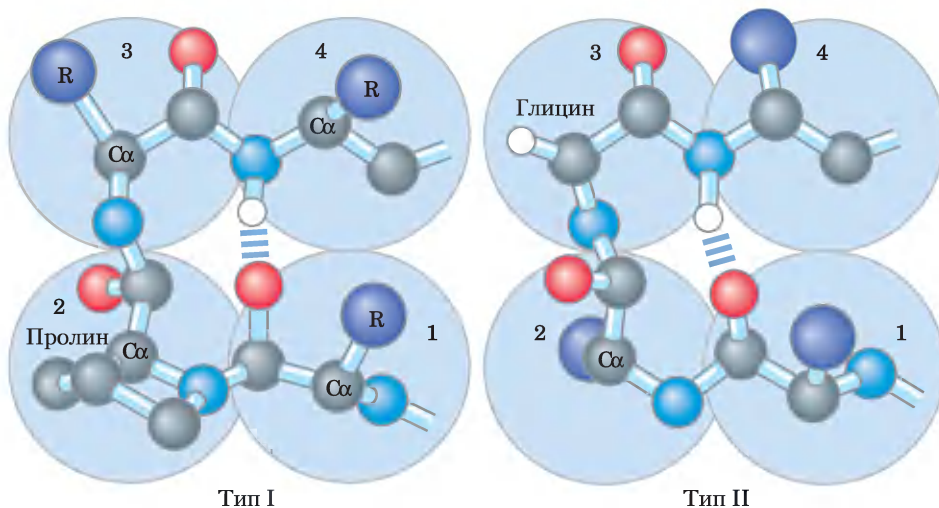
Некоторые аминокислотные последовательности ограничивают возможности образования β -слоев. В частности, для того чтобы в белке два (или более) β -слоя могли при укладке сопри-

касаться, R-группы аминокислотных остатков должны иметь сравнительно небольшие размеры. Например, в таких β -кератинах, как фиброины шелка и паутины, очень высокое содержание остатков Gly и Ala, R-группы которых самые маленькие. В фиброине шелка на протяжении довольно длинных участков последовательности чередуются остатки Gly и Ala.

В белковых структурах часто встречаются β -повороты

 **Архитектура белка — β -поворот.** В глобулярных белках, характеризующихся компактной упаковкой полипептидных цепей, около трети всех аминокислотных остатков приходится на повороты и петли, возникающие при изменении направления укладки полипептидной цепи (рис. 4-7). Эти элементы структуры связывают между собой участки α -спиралей и β -слоев.

а β -Повороты



б Изомеры пролина

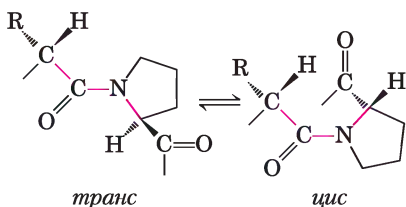


Рис. 4-7. Структура β -поворота. а) Наиболее распространены в белках β -повороты типа I и II, причем тип I встречается в два с лишним раза чаще, чем тип II. В β -поворотах типа II в третьей позиции всегда находится остаток Gly. Обратите внимание на водородные связи между первым и четвертым остатками петли (отдельные аминокислотные остатки схематично изображены в виде больших голубых шаров и пронумерованы). б) *транс*- и *цис*-Изомеры пептидной связи с участием иминогруппы пролина. 99,95% пептидных связей в белках имеют *транс*-конфигурацию. Исключение составляют пептидные связи с участием Pro: 6% образуемых им пептидных связей имеют *цис*-конфигурацию; многие из этих связей расположены в β -поворотах.

Наиболее часто встречаются β -повороты, связывающие концы двух соседних участков антипараллельного β -слоя. Эта структура представляет собой повернутую на 180° петлю, в которой задействовано четыре аминокислотных остатка, причем кислород карбонильной группы первого остатка образует водородную связь с водородом аминогруппы четвертого остатка. Пептидные группы двух средних остатков не участвуют в образовании никаких водородных связей с другими остатками. Часто в этих структурах встречаются остатки Gly и Pro: первый — благодаря своему малому размеру и гибкости, а второй — благодаря легкости, с которой пептидная связь с участием азота иминогруппы пролина принимает *цис*-конфигурацию, способствующую образованию петли (рис. 4-7, б). На рис. 4-7, а представлены два типа β -поворотов, которые наиболее часто встречаются в белках. Эти структуры обычно находятся близко к поверхности белка, где две средние аминокислоты из тех четырех, что образуют поворот, могут участвовать в образовании водородных связей с водой. Сравнительно реже в белках можно встретить состоящие из трех аминокислотных остатков γ -повороты, в которых водородная связь возникает между первым и третьим остатками.

Вторичные структуры белка характеризуются определенными углами связей

Наиболее распространенными вторичными структурами в большинстве белковых молекул являются α -спирали и β -слои, хотя в некоторых специализированных белках встречаются и другие вторичные структуры (например, в коллагене, рис. 4-12). Вторичную структуру можно полностью описать с помощью значений углов ϕ и ψ , образуемых связями в аминокислотных остатках. Как видно из карты Рамачандрана, α -спирали и β -слои попадают в довольно узкий диапазон разрешенных конформаций (рис. 4-8, а). Значения углов ϕ и ψ большинства известных белковых структур попадают в необходимый диапазон, причем в основном соответствующий именно конформации α -спирали и β -слоя (рис. 4-8, б). Единственной аминокислотой, чьи

характеристики выпадают из этого диапазона, является глицин. Благодаря малому размеру боковой цепи (там только один атом водорода) остаток глицина может участвовать в образовании самых разных конформаций, запрещенных для других аминокислот.

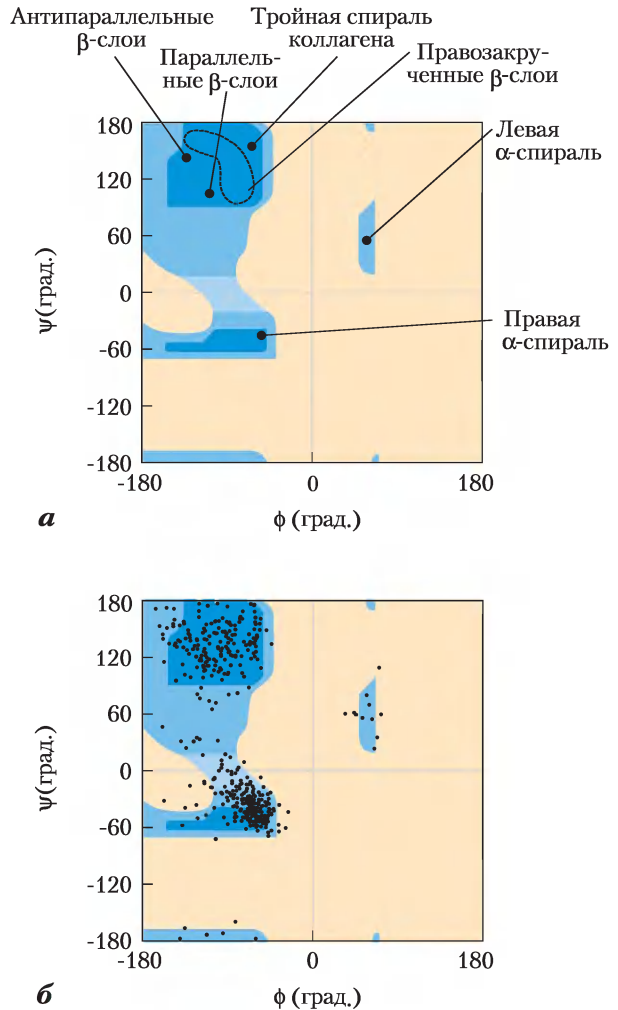


Рис. 4-8. Карта Рамачандрана для различных белковых структур. а) На график, представленный на рис. 4-3, нанесены значения ϕ и ψ для различных вторичных структур. Хотя левые α -спирали длиной в несколько аминокислот теоретически могут существовать, в белках такой структуры не обнаружено. б) На карте разрешенных конформаций (рис. 4-3) нанесены значения ϕ и ψ для всех аминокислотных остатков (за исключением глицина) пируваткиназы кролика. Небольшие и способные принимать различные конфигурации остатки Gly исключены из рассмотрения, поскольку они часто выпадают из разрешенного диапазона (синего цвета).

Вторичные структуры можно идентифицировать с помощью метода кругового дихроизма

Молекулы с асимметричной структурой по-разному поглощают правую и левую компоненты плоскополяризованного света. Измерение этих различий лежит в основе **спектроскопии кругового дихроизма** (КД). Упорядоченные структуры, такие как α -спирали и β -слои, имеют спектры поглощения, в которых могут быть пики и впадины. Спектры белков снимают в дальней ультрафиолетовой области (от 190 до 250 нм). Поглощающей (хромофорной) единицей в данном случае является пептидная связь; сигнал получают от пептидной связи, находящейся в окружении свернутого белка. Разницу молярных коэффициентов экстинкции (см. доп. 3-1) для левополяризованного и правополяризованного света ($\Delta\epsilon$) откладывают на графике как функцию

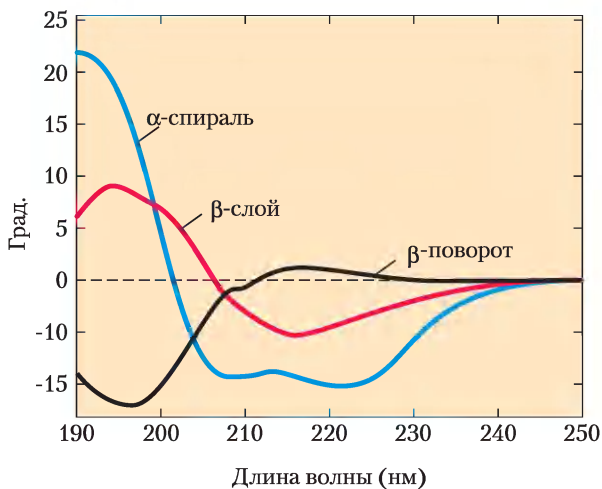


Рис. 4-9. Спектры кругового дихроизма полилизина в виде α -спирали, β -слоя или денатурированной случайной спирали. На оси у отложены углы поворота в градусах — единицах, чаще всего используемых в экспериментах по КД. Поскольку в случае α -спирали, β -слоя и денатурированной случайной спирали спектры различаются между собой, спектр КД образца белка можно использовать для грубой оценки доли белка, имеющего одну из двух наиболее распространенных типов вторичной структуры. Спектр КД нативного белка может служить контролем, соответствующим полностью свернутому белку, что удобно при изучении денатурации или конформационных изменений, вызванных изменениями условий в растворе.

длины волны. α -Спирали и β -слои имеют характерные спектры КД (**рис. 4-9**). С помощью спектров КД можно установить, правильно ли свернут белок, оценить долю белка, находящегося в той или иной конформации, а также следить за переходами между денатурированным и неденатурированным белком.

Краткое содержание раздела 4.2 ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА

- Вторичная структура — это упорядоченная структура аминокислотных остатков на участке полипептидной цепи, в котором все остатки расположены в пространстве строго определенным образом по отношению друг к другу.
- Наиболее распространенными регулярными вторичными структурами белков являются α -спирали, β -слои и β -повороты.
- Вторичная структура участка полипептидной цепи полностью описывается набором значений углов ϕ и ψ для всех аминокислотных остатков в этом участке.
- Спектры кругового дихроизма позволяют идентифицировать в белке области с основными типами вторичной структуры, а также следить за процессом свертывания.

4.3. Третичная и четвертичная структуры белка


Архитектура белка — введение в третичную структуру. Общая организация всех атомов белка в пространстве называется **третичной структурой**. Если термин «вторичная структура» относится к пространственной организации аминокислотных остатков, расположенных близко друг от друга в полипептидной цепи, третичная структура подразумевает способ организации молекулы белка *в целом*. Аминокислотные остатки, находящиеся далеко друг от друга в полипептидной цепи и участвующие в образовании различных типов вторичной структуры, могут взаимодействовать друг с другом в полностью уложенном белке. Локализация изгибов цепи (в том числе и β -поворотов),

а также направление связей и торсионные углы определяются числом и расположением специфических остатков Pro, Thr, Ser и Gly. Взаимодействующие между собой участки полипептидной цепи удерживаются в характерном положении в пространстве под действием слабых сил (а иногда и ковалентными связями, таких как дисульфидные мостики).

Некоторые белки состоят из двух или большего числа отдельных полипептидных цепей, называемых субъединицами, которые могут быть как одинаковыми, так и разными. Взаимное расположение субъединиц белка в пространстве определяет **четвертичную структуру** белка.

При рассмотрении этих более высоких уровней организации белковой структуры удобно разделить все белки на два основных класса: **фибриллярные белки**, полипептидные цепи которых организованы в виде длинных нитей или волокон, и **глобулярные белки**, чьи полипептидные цепи образуют сферические структуры — глобулы. Эти два класса белков заметно различаются по структуре: фибриллярные белки обычно характеризуются одним типом вторичной структуры, а отдельные участки глобулярных белков часто имеют разную вторичную структуру. Два класса белков различаются и по основным функциям: те структуры в организмах позвоночных, которые определяют их жесткость, форму и защиту от внешних воздействий, построены из фибриллярных белков, а большинство ферментов и регуляторных белков имеют глобулярное строение. Некоторые фибриллярные белки сыграли очень важную роль в развитии современных представлений о структуре белка и служат прекрасными примерами, иллюстрирующими взаимосвязь между структурой белка и его функцией. Мы начнем с изучения третичной структуры фибриллярных белков, а затем обратимся к более сложному типу укладки полипептидной цепи, характерной для глобулярных белков.

Фибриллярные белки адаптированы для выполнения структурной функции

 **Архитектура белка — третичная структура фибриллярных белков.** На примере α -кератина, коллагена и фиброина шелка можно прекрасно продемонстрировать связь между структурой белка и его функцией (табл. 4-2). Фибриллярные белки обладают свойствами, определяющими прочность и (или) гибкость тех структур, в построении которых они принимают участие. В любом случае основной структурной единицей таких белков является повторяющийся элемент вторичной структуры. Фибриллярные белки не растворяются в воде, что связано с высокой концентрацией гидрофобных аминокислотных остатков как внутри белка, так и на его поверхности. Гидрофобные поверхности белков в значительной степени скрыты, поскольку сходные по свойствам полипептидные цепи укладываются рядом и образуют надмолекулярные комплексы. Простота строения фибриллярных белков делает их удобным примером для изучения основных принципов структурной организации белка, которые мы обсуждали выше.

α -Кератин. Эти фибриллярные белки созданы природой для придания жесткости структурам организма. У млекопитающих эти белки — основные компоненты волос, шерсти, ногтей, когтей, перьев, рогов, копыт и многих других поверхностных образований кожи. α -Кератины относятся к широкому семейству белков — промежуточным филаментам. Другие белки промежуточных филаментов обнаружены в цитоскелете клеток животных. Все белки этого семейства выполняют структурную функцию и имеют такие же структурные особенности, как α -кератины.

Молекула α -кератина представляет собой правую спираль, которая встречается во многих других белках. Фрэнсис Крик и Лайнус Полинг

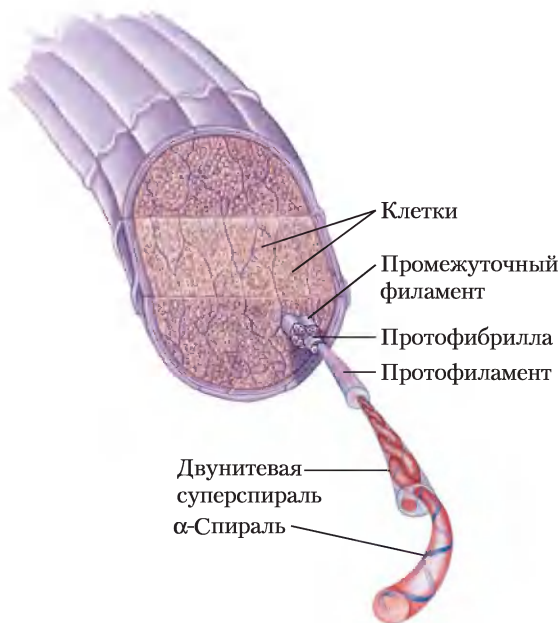
Таблица 4-2 Вторичная структура и свойства фибриллярных белков

Структура	Характеристика	Примеры
α -Спирали, сшитые дисульфидными связями	Прочные, нерастворимые в воде защитные структуры различной жесткости	α -Кератин волос, перьев и ногтей
β -Конформация	Мягкие, гибкие волокна	Фиброин шелка
Тройная спираль коллагена	Высокая прочность и эластичность при растяжении	Коллаген в сухожилиях и в костной ткани

а



б



Поперечный срез волоса

Рис. 4-10. Структура волоса. а) α -Кератин волос образован вытянутыми α -спиралями с утолщениями на N- и C-концах аминокислотных цепей. Спирали попарно закручены одна вокруг другой, в результате чего образуется левая двойная суперспираль. Эти суперспирали в свою очередь организованы в другие высокоупорядоченные структуры — протофиламенты и протофибриллы. Около четырех протофибрилл (32 цепи α -кератина, собранные вместе) образуют промежуточный филамент. В других структурах также наблюдается сцепление отдельных суперспиралей, но направление образующихся спиралей и структурные детали неизвестны. б) Волос представляет собой пучок из множества нитей α -кератина, построенных таким образом, как показано на рисунке (а).

в начале 1950-х гг. независимо друг от друга пришли к выводу, что α -спираль кератина организована в виде двухспиральной катушки. Две ориентированные параллельно нити α -кератина (т. е. с N-концами с одной и той же стороны) закручиваются одна вокруг другой, образуя суперскрученную спираль. Такая суперскрученность придает всей структуре дополнительную прочность — точно так же, как скрученные веревки придают прочность канату (рис. 4-10). Искривление оси α -спирали, образующей спиральную катушку, объясняет расхождение между расчетным значением витка спирали (5,4 Å), полученным Полингом и Кори, и экспериментальным значением (5,15–5,20 Å), полученным при рентгеноструктурном анализе волоса (с. 177). Супервитки α -спирали образуют левую спираль, т. е. супервитки закручены в другую сторону, чем сама α -спираль. Поверхности соприкосновения двух α -спиралей состоят из гидрофобных аминокислотных остатков, а их R-группы сцеплены друг с другом регулярным образом. Это создает компактную упаковку полипептидных цепей в левозакрученной суперспирали. Неудивительно, что α -кератины богаты такими гидрофобными остатками, как Ala, Val, Leu, Ile, Met и Phe.

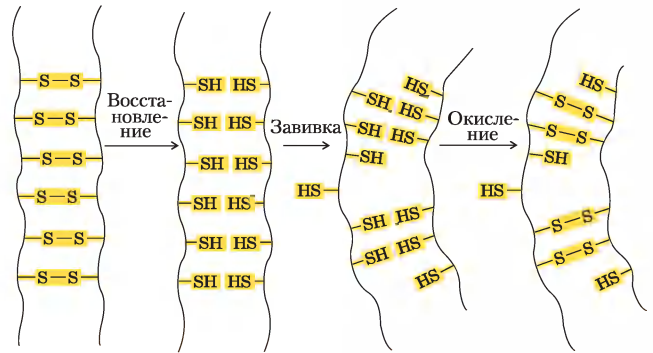
Отдельные полипептидные цепи в двойной спирали α -кератина имеют сравнительно простую третичную структуру, в которой доминируют α -спиральные участки, сами образующие левые суперспирали вокруг своей оси. Взаимодействие между отдельными α -спиралями представляет собой пример четвертичной структуры. Спиральные катушки такого типа являются распространенным структурным элементом в фибриллярных белках и в мышечном белке миозине (рис. 5-27). Четвертичная структура α -кератинов может быть и сложнее. Множество спиральных катушек могут быть собраны в большой надмолекулярный комплекс; такую структуру, например, имеют молекулы α -кератина в промежуточных филаментах волос (рис. 4-10, б).

Прочность фибриллярных белков дополнительно повышается за счет ковалентных сшивков между отдельными полипептидными цепями и между отдельными нитями в надмолекулярной структуре. В α -кератинах в качестве таких стабилизирующих четвертичную структуру связей выступают дисульфидные мостики (доп. 4-2). В самых жестких и прочных α -кератинах, таких как в роге носорога, до 18% аминокислотных остатков

Дополнение 4–2 Перманентная завивка волос — пример биохимической технологии

Известно, что влажные волосы при нагревании способны растягиваться. На молекулярном уровне это означает, что α -спирали α -кератина растягиваются до тех пор, пока не примут плоскую β -конформацию. При охлаждении они самопроизвольно возвращаются в конформацию α -спирали. Такая характерная эластичность α -кератинов и наличие множественных дисульфидных мостиков являются молекулярной основой химической завивки волос. Волосы сначала накручивают на бигуди, чтобы получились кудри определенной формы, а затем при нагревании обрабатывают раствором восстанавливающего агента, которым обычно служит вещество с тиоловой или сульфгидрильной группой ($-SH$). Восстановитель расщепляет дисульфидные связи, в результате чего из каждой связи образуются два остатка цистеина. Влага и тепло разрушают водородные связи и заставляют раскручиваться α -спирали. Через некоторое время восстановитель смывают, волосы обрабатывают раствором окислителя, под действием которого образуются новые дисульфидные связи между парами остатков цистеина, расположенных на соседних полипептидных цепях (но это совсем не те

пары остатков Cys, что были раньше). После того как волосы высохли и охладились, полипептидные цепи вновь принимают конформацию α -спирали. Волосы выются, поскольку новые дисульфидные связи зафиксировали пучки α -спиралей кератиновых волокон в определенном положении. Перманентная завивка или выпрямление волос на самом деле держатся не бесконечно, поскольку волосы отрастают. Старые волосы постепенно заменяются новыми с естественным расположением дисульфидных связей.



приходится на долю цистеина, участвующего в образовании дисульфидных связей).

Коллаген. Подобно α -кератинам, коллаген обеспечивает прочность структур организма. Он присутствует в соединительных тканях, таких как сухожилия, хрящи, органическое вещество костного матрикса и роговица глаза. Спираль коллагена — это уникальная вторичная структура, отличающаяся от α -спирали. Полипептидные цепи коллагена уложены в левую спираль, один виток которой построен из трех аминокислотных остатков (рис. 4-11). Эти спирали также образуют суперспиральные структуры, однако имеющие совсем другое строение: три полипептидных цепи, называемые α -цепями (не путайте с α -спиралями), закручены одна вокруг другой (рис. 4-11, в). В коллагене суперспираль закручена вправо — в противоположном направлении, чем левые спирали α -цепей.

У позвоночных существует несколько типов коллагенов. Обычно эти белки содержат около 35% Gly, 11% Ala, а также 21% Pro и 4-Нур (ами-

нокислота 4-гидроксипролин, рис. 3-8, а). Из коллагена получают пищевой желатин, который имеет небольшую пищевую ценность, поскольку содержит очень мало аминокислот, важных для организма человека. Необычный аминокислотный состав коллагена определяет его уникальную структуру. Последовательность аминокислот в коллагене обычно представляет собой чередование трипептидных звеньев Gly-X-Y, где часто X — пролин Pro, а Y — 4-гидроксипролин Нур. Только остаток Gly может поместиться в узкую щель между отдельными α -цепями (рис. 4-11, з), а остатки Pro и 4-Нур обеспечивают крутой поворот спирали коллагена. Аминокислотная последовательность и суперспиральная структура коллагена приводят к тому, что три полипептидных цепи очень плотно упакованы. В структуре коллагена очень важен 4-гидроксипролин; эта аминокислота сыграла определенную роль в истории человечества (доп. 4-3).

Тесное сплетение α -цепей в тройной спирали коллагена в пересчете на единицу площади поперечного сечения обеспечивает при растяжении

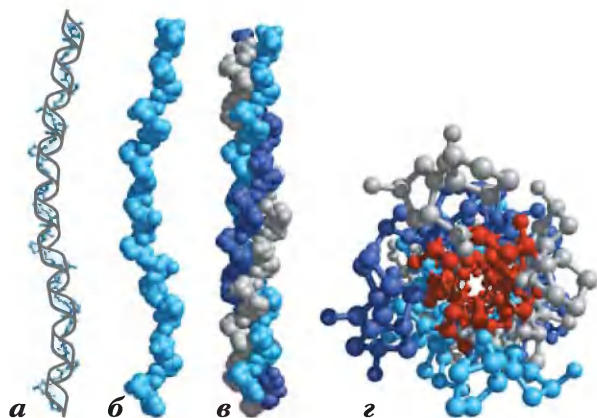
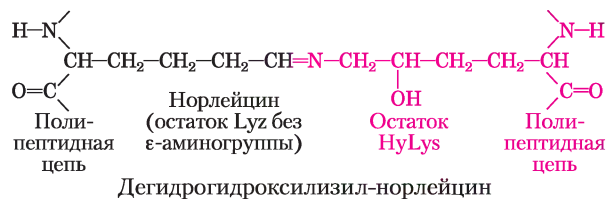


Рис. 4-11. Структура коллагена (по данным PDB ID 1CGD)
 а) α -Цепь коллагена имеет уникальную вторичную структуру. Повторяющаяся трипептидная последовательность Gly-X-Pro или Gly-X-4-Нур образует левую спираль с тремя остатками в одном витке. В изображенной модели использована последовательность Gly-Pro-4-Нур.
 б) Пространственная модель той же α -цепи.
 в) Три подобные цепи (изображены серым, синим и лиловым цветом) обвивают друг друга, образуя правую спираль.
 г) Шаро-стержневая модель тройной суперспирали коллагена (вид с одного конца). Красным цветом показаны остатки Gly. Только глицин, имеющий самый маленький размер, может поместиться в таком узком пространстве, как место контакта трех полипептидных цепей. Размер шариков в данной модели не соответствует ван-дер-ваальсовым радиусам атомов. Внутри этой тройной суперспирали нет пустого пространства, как изображено на рисунке; на самом деле полипептидные цепи находятся в очень тесном контакте.

более высокую прочность, чем прочность стальной проволоки. Нити коллагена (рис. 4-12) представляют собой надмолекулярные структуры, состоящие из тройных спиралей коллагена (иногда называемых тропоколлагеном), связанных между собой различным образом, что приводит к образованию структур с разной прочностью. Связывание α -цепей коллагена между собой происходит необычно — посредством ковалентной связи с участием остатков Lys, HyLys (5-гидроксилизина, рис. 3-8, а) или His, время от времени встречающихся в позициях X или Y трипептидного звена коллагена. Подобное связывание приводит к образованию необычных аминокислотных остатков, таких как дегидрогидроксилизинонорлейцин. По мере старения организма в фибриллах коллагена появляется больше поперечных сшивок,

что делает соединительные ткани все более жесткими и хрупкими.



Обычно у млекопитающих присутствует более 30 структурных разновидностей коллагена, характерных для определенных видов тканей и несколько различающихся по аминокислотной

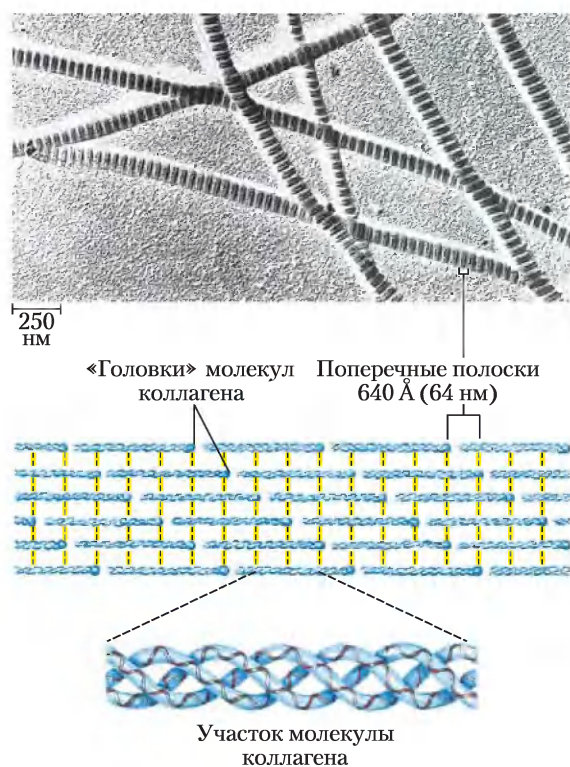


Рис. 4-12. Структура фибрилл коллагена. Молекула коллагена ($M_r = 300\,000$) имеет форму палочки длиной около 3000 Å и шириной лишь 15 Å. Три закрученные в спираль α -цепи коллагена могут иметь различные последовательности, но каждая состоит примерно из 1000 аминокислотных остатков. Фибриллы коллагена состоят из вытянутых молекул коллагена, сшитых между собой для дополнительной прочности. Специфическое расположение и степень сшивки в разных тканях различаются. На электронных микрофотографиях фибриллы коллагена имеют характерные поперечные полосы. «Головки» молекул коллагена расположены через каждые 640 Å.



...после этого несчастья, а также из-за общей нездоровой обстановки в этом краю, где никогда не выпадает ни капли дождя, нас всех поразила «лагерная болезнь», заключавшаяся в том, что наши конечности стали усыхать, кожа на ногах, подобно старому башмаку, стала покрываться черными пятнами, как будто плесенью, опухали десны, и никто из заболевших не вырвался из лап смерти. Знак был такой: если пошла из носа кровь, то смерть близко...

– Из воспоминаний лорда Джоинвилля,
около 1300 г.

Данный фрагмент текста описывает состояние армии Людовика IX на момент окончания седьмого крестового похода (1248–1254), незадолго до битвы при Фараскуре, где ослабленная цингой армия крестоносцев была окончательно разбита египтянами. В чем была причина болезни, поразившей воинов в XIII в.?

Цинга возникает при недостатке витамина С (аскорбиновой кислоты). Витамин С, кроме прочего, необходим для гидроксирования пролина и лизина в составе коллагена; при дефиците витамина С происходит общее поражение соединительной ткани. Проявлениями прогрессирующего заболевания являются частые небольшие кровотечения, связанные с хрупкостью сосудов, выпадение зубов, медленное заживление ран и открытие старых ран, боль и слабость костей, а в конечном итоге – остановка сердца. Отмечается подавленное настроение и повышенная чувствительность к раздражителям разного рода. При недостаточности витамина С средней тяжести возможны утомляемость, раздражительность и более тяжелое протекание инфекционных заболеваний дыхательных путей. Многие животные синтезируют витамин С в больших количествах путем четырехстадийного ферментативного превращения глюкозы в аскорбат. Однако в процессе эволюции человек и некоторые другие животные (гориллы, морские свинки и фруктовые летучие мыши) утратили последний из четырех ферментов, необходимых для осуществления этого процесса, и поэтому должны получать аскорбиновую кислоту с пищей. Витамин С содержится во многих фруктах и овощах. Однако до 1800 г. он часто отсутствовал в продуктах, запасаемых на зиму или для дальних путешествий.

Цинга была описана египтянами в 1500 г. до н. э., а затем Гиппократом в V в. до н. э. Хотя цинга оказыва-

ла немаловажное влияние на ход средневековых войн и периодически давала о себе знать в зимнее время в странах с холодным климатом, более пристальное внимание к этому заболеванию было обращено только во времена великих географических открытий – с 1500 по 1800 г., которые потребовали дальних путешествий. В первом кругосветном путешествии, совершенном Фернандо Магелланом (1520 г.), цинга унесла жизнь более 80% членов экспедиции. Васко да Гама по той же причине потерял две трети своей команды в первой экспедиции в Индию (1499 г.). Во время второго путешествия Жака Картье на реку Святого Лаврентия его экспедиция испытала множество превратностей судьбы, ей грозила полная гибель; благо, что местные жители научили команду заваривать кедровый чай, который излечивал и предотвращал цингу (поскольку содержал витамин С). По оценкам, в период от 1600 до 1800 г. около миллиона моряков умерли от цинги. Зимние вспышки цинги в Европе постепенно исчезли в XIX в., что, по видимому, было связано с распространением картофеля, ввезенного из Южной Америки.

В 1747 г. шотландский врач Джеймс Линд, служивший в Королевской армии, провел первые в истории зарегистрированные контролируемые испытания. При длительном плавании на 50-пушечном *военном корабле Сэлсбери* он разделил 12 страдавших от цинги моряков на группы по два человека. Все 12 ели одну и ту же пищу, но получали разные лекарства, применявшиеся в то время для лечения цинги. Те матросы, которые ели лимоны и апельсины, поправлялись и вновь были способны работать, те, кто пил кипяченый яблочный сок, поправлялись слабо, а состояние остальных ухудшалось. В 1753 г. Линд издал «Трактат о цинге», однако еще на протяжении 40 лет в Королевском флоте не предпринимались никакие меры. Наконец, в 1795 г.



Джеймс Линд (1716–1794),
военно-морской врач с 1739 по 1748 г.

Британское адмиралтейство издало указ о введении концентрированного сока лимона или лайма в рацион всех британских моряков (отсюда пошло прозвище английских моряков «лайми»). Цинга оставалась бедствием в некоторых частях света до 1932 г., когда венгерский ученый Альберт Сент-Дьердьи, а также У. А. Воу и С. Г. Кинг из Университета Питтсбурга выделили и синтезировали аскорбиновую кислоту.

L-Аскорбиновая кислота (витамин С) представляет собой белый кристаллический порошок, не имеющий запаха. Он хорошо растворяется в воде и почти не растворяется в органических растворителях. В виде сухого порошка и вне досягаемости прямых солнечных лучей вещество довольно стабильно. До сих пор нет единого мнения о суточной норме потребления витамина С. В США рекомендуемая суточная норма составляет 60 мг, в Австралии и Великобритании — 30–40 мг, в России — 100 мг. Иногда советуют принимать более высокие дозы витамина С, хотя до сих пор однозначно не установлено, приносит ли это дополнительную пользу. Интересно, что такое содержание витамина С, как в организме животных, способных его самостоятельно синтезировать, в организме человека достигается только при потреблении дозы, в сотни раз превосходящей рекомендованную суточную дозу. Кроме цитрусовых и многих других свежих фруктов хорошим источником витамина также являются перец, томаты, картофель и брокколи. При длительном приготовлении или хранении фруктов и овощей витамин С в них разрушается.

Итак, почему же витамин С так необходим для здоровья? Для нас особый интерес представляет его участие в формировании коллагена. Коллаген построен из повторяющихся трипептидных звеньев состава Gly–X–Y, где обычно X и Y — это Pro или 4-Нур, производное пролина 4(R)-L-гидроксипролин, который играет важную роль в фолдинге и поддержании структуры коллагена. Синтетические пептиды из 10 повторов Gly–Pro–Pro могут складываться в тройную спираль коллагена, однако эта структура плавится при 41 °С. Если же пептид состоит из звеньев состава Gly–Pro–Нур, то точка плавления тройной спирали повышается до 69 °С. Стабильность коллагена напрямую связана с его тройной спиралью, строение которой независимо определили Хелен Берман и Адриана Загари с коллегами. Пролин обычно присут-

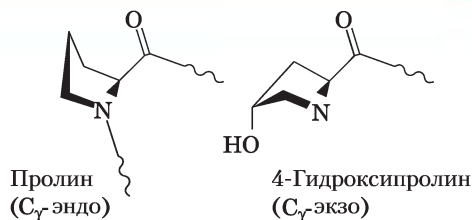


Рис. 1. C_γ-эндо-конформация пролина и C_γ-экзо-конформация 4-гидроксипролина.

ствует в двух конформациях, называемых C_γ-эндо и C_γ-экзо (рис. 1). Для образования спирали коллагена необходимо, чтобы остаток пролина в положении Y находился в C_γ-экзо-конформации, образованию которой способствует наличие гидроксильной группы у атома C-4 в 4-гидроксипролине. Структура коллагена также требует, чтобы остаток Pro в позиции X находился в конформации C_γ-эндо, и введение в эту позицию 4-Нур дестабилизирует спираль. Невозможность гидроксильровать Pro в позиции Y при дефиците витамина С приводит к нестабильности структуры коллагена и тем проблемам с соединительной тканью, которые возникают при цинге.

Для гидроксильрования остатков Pro в предшественнике коллагена проколлагене необходим фермент пролил-4-гидроксилаза. У всех позвоночных этот фермент представляет собой α2β2-тетрамер с молекулярной массой 240 000. Активность пролилгидроксилазы связана с α-субъединицей. (Ученые были удивлены, обнаружив, что β-субъединицы этого белка такие же, как в ферменте дисульфидизомеразе белков; эти субъединицы не участвуют в проявлении пролилгидроксилазной активности.) Каждая α-субъединица содержит один атом негемового железа (Fe²⁺); фермент относится к классу гидроксилаз, которым для проявления активности необходим α-кетоглутарат.

В реакции с участием пролилгидроксилазы (рис. 2, а) с ферментом связана одна молекула кислорода и одна молекула α-кетоглутарата. α-Кетоглутарат подвергается окислительному декарбоксилированию с образованием CO₂ и сукцината. Оставшийся на ферменте атом кислорода затем используется для гидроксильрования остатка Pro в проколлагене. Для этой реакции аскорбиновая кислота не нужна. Однако пролилгидроксилаза катализирует также окислительное декарбоксилирование α-кетоглутарата; эта реакция не связана с гидрок-

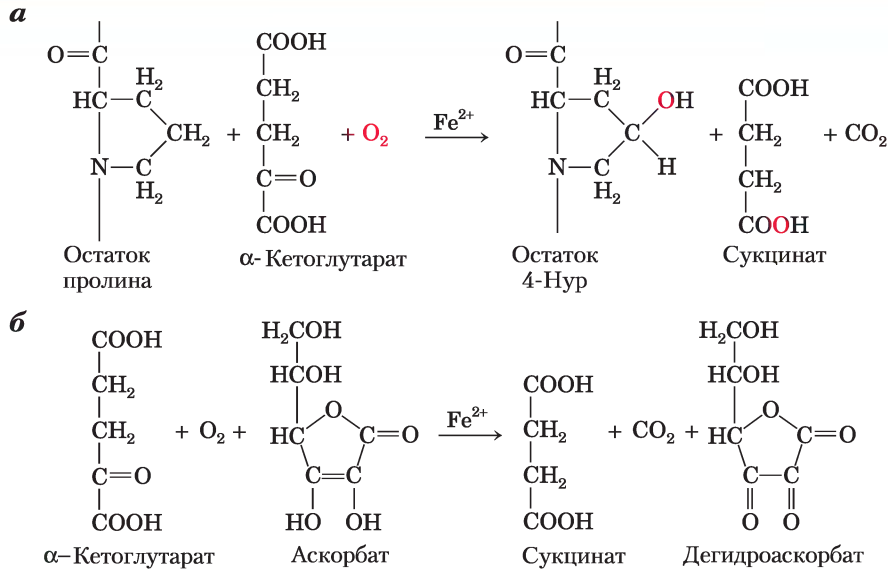


Рис. 2. Реакции, катализируемые пролил-4-гидроксилазой. *а*) Нормальная реакция, сопряженная с гидроксированием пролина: для этой реакции аскорбиновая кислота не нужна. Атомы кислорода, происходящие из молекулы O_2 , выделены красным цветом. *б*) Несопряженная реакция, в которой α -кетоглутарат подвергается окислительному декарбоксилированию, а гидроксирование пролина не происходит. Аскорбиновая кислота потребляется в соответствии со стехиометрией уравнения реакции и превращается в дегидроаскорбат.

сированием пролина (рис. 2, б). В данной реакции происходит окисление гемового железа, а окисленная форма фермента не проявляет активности, т. е. не гидроксимирует пролин. Считается, что аскорбат в данной реакции служит для восстановления гемового железа и реактивации фермента.

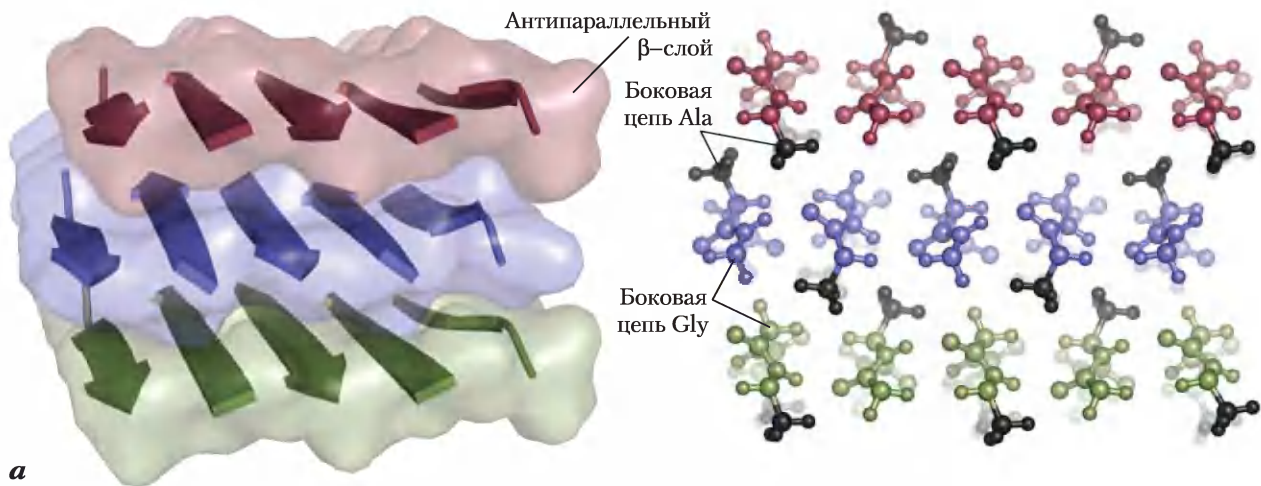
Люди болеют цингой до сих пор, причем не только в тех регионах, где существуют проблемы с продуктами питания, но и, как это не удивительно, в американских колледжах. Готовые салаты — единственные

овощное блюдо в рационе питания некоторых студентов, да и фруктов они едят крайне мало. Проведенное в 1998 г. обследование 230 студентов Университета Аризоны показало, что 10% из них страдали серьезной недостаточностью витамина С, а у двух студентов уровень витамина С был настолько низким, что они, по всей видимости, были больны цингой. Только половина студентов потребляли рекомендованную суточную норму витамина С.

Ешьте больше фруктов и овощей!

последовательности и функций. Некоторые генетические дефекты человека, связанные со структурой коллагена, служат примером тесной связи между аминокислотной последовательностью и трехмерной структурой этого белка. Несовершенный остеогенез характеризуется аномальным развитием костей у младенцев, а синдром Элерса–Данлоса проявляется гипермобильностью суставов. Оба этих состояния могут быть

летальными, и оба связаны с заменой Gly в каждой α -цепи на аминокислоту, имеющую более объемную R-группу, например Cys или Ser (в двух названных заболеваниях происходит замена разных остатков Gly). Замена всего лишь одного аминокислотного остатка приводит к катастрофическим последствиям, поскольку нарушает трипептидное звено Gly–X–Y — основу уникальной спиральной структуры коллагена. Если учесть роль



а



б

70 мкм

Gly в образовании тройной спирали коллагена (рис. 4-11, з), становится понятно, что его замена на любую другую аминокислоту обязательно приведет к нарушению структуры этого белка. ■

Фиброин шелка. Белок шелка фиброин синтезируют насекомые и пауки. Его полипептидные цепи существуют преимущественно в β -конформации. Фиброин содержит много остатков Ala и Gly, что способствует плотной упаковке β -слоев и взаимному проникновению их R-групп (рис. 4-13). Вся структура в целом стабилизируется протяженными водородными связями между пептидными группами всех полипептидов в каждом β -слое, а также за счет оптимизации ван-дер-ваальсовых взаимодействий между слоями. Шелк не тянется, поскольку

Рис. 4-13. Структура шелка. И нити при изготовлении шелковых тканей, и паутина состоят из белка фиброина. а) Фиброин построен из уложенных в лист антипараллельных β -слоев. Полипептидные последовательности белка богаты остатками Ala (лиловые) и Gly (желтые). Их небольшие R-группы способствуют плотной упаковке β -слоев, как показано на рисунке (вид сбоку). б) Окрашенная электронная микрофотография демонстрирует выход нитей фиброина (синего цвета) из прядильного органа паука.

ку полипептидные цепи в β -конформации и так максимально растянуты (рис. 4-6). Однако подобная структура довольно гибкая, поскольку слои удерживаются вместе не ковалентными связями, такими как дисульфидные мостики в α -кератинах, а множеством слабых взаимодействий.

Разнообразие структур отражает функциональное многообразие глобулярных белков

В глобулярных белках отдельные участки полипептидной цепи (или несколько полипептидных цепей) уложены вместе, образуя более компактную структуру, чем у фибриллярных белков (рис. 4-14). Сворачивание (фолдинг) белка

обеспечивает также структурное многообразие, необходимое белкам для осуществления самых разных биологических функций. Глобулярную структуру имеют ферменты, транспортные белки, двигательные белки, регуляторные белки, иммуноглобулины и множество других белков с разными функциями.

Число известных трехмерных структур белков исчисляется тысячами, и каждые два года это число увеличивается еще в два с лишним раза. Такое богатство информации коренным образом меняет наши представления о структуре белка, о связи структуры и функций, а также о тех эволюционных путях, которые привели к возникновению белков в их современном состоянии. Огромное многообразие белковых структур может показаться устрашающим. Однако по мере определения структур все новых и новых белков становится ясно, что все они относятся к ограниченному набору узнаваемых и устойчивых типов.

Наше обсуждение структур глобулярных белков мы начнем с рассказа о принципах строения, выведенных на основании структур самых первых изученных белков. Далее мы подробно остановимся на описании и сравнительной классификации надмолекулярных структур белков. Подобное обсуждение стало возможным только

β -конформация
2 000 × 5 Å

α -спираль
900 × 11 Å

Нативная
глобулярная структура
100 × 60 Å

Рис. 4-14. Структуры глобулярных белков компактны и весьма разнообразны. Альбумин сыворотки крови человека ($M_r = 64\,500$) имеет одну полипептидную цепь, состоящую из 585 аминокислотных остатков. Сравниваются гипотетические размеры полипептидной цепи альбумина, находящейся исключительно в β -конформации или в виде α -спирали. Для сравнения также показан относительный размер белка в его нативной глобулярной форме по данным рентгеноструктурного анализа. Чтобы достичь таких крохотных размеров, полипептидная цепь должна быть очень плотно упакована.

благодаря такому мощному источнику информации, каким является Интернет, в частности благодаря находящимся в свободном доступе базам данных, таким как Protein Data Bank (доп. 4-4).

Дополнение 4-4 Protein Data Bank

Уже известные трехмерные структуры белков на сегодняшний день исчисляются тысячами и через каждые два года возрастает более чем вдвое. Это обилие информации произвело революцию в нашем понимании структуры белков, взаимосвязей их структуры и функции, а также путей эволюции белков к нынешнему состоянию, которые можно проследить по «фамильному» сходству, что приоткрывается нам по мере отбора и сортировки данных в базах данных. Один из важнейших для биохимиков доступных ресурсов — **Protein Data Bank** (PDB; www.rcsb.org).

PDB представляет собой архив экспериментально полученных трехмерных структур биологических макромолекул, включающий практически все структуры макромолекул (белки, ДНК, РНК и т. д.). Каждой структуре присвоен идентификационный номер (четырёхбуквенный шифр, называемый PDB ID). Эти номера указаны в данной книге в подрисуночных подписях к

каждому изображению структуры, взятой из базы PDB, что позволяет студентам и преподавателям исследовать приведенные структуры самостоятельно. В PDB описаны пространственные координаты каждого атома, положение которого было определено (многие приведенные в каталоге структуры еще не полностью описаны). В дополнительных файлах содержится информация о том, как была определена структура, и ее точность. По координатам атомов можно визуализировать структуру макромолекулы с помощью специальной программы. Приветствуется посещение PDB студентами и исследование структур с помощью программы визуализации, на которую есть ссылка в базе. Кроме того, файлы со структурами макромолекул можно скачать и исследовать у себя на компьютере с помощью свободно распространяемых программ, таких как RasMol, Protein Explorer или FirstGlance на Jmol, они доступны по адресу www.umass.edu/microbio/rasmol.

Исследование структуры миоглобина позволило подобрать первые ключи к разгадке глобулярной структуры белка

Архитектура белка — третичная структура небольших глобулярных белков, II. Миоглобин. Первым прорывом в понимании трехмерной структуры белка стало исследование молекулы миоглобина методом рентгеноструктурного анализа, осуществленное Джоном Кендрию с коллегами в 1950-х гг. Миоглобин — это относительно небольшой белок мышечных клеток ($M_r = 16\,700$), связывающий кислород. Его функция заключается как в хранении кислорода, так и в облегчении его диффузии в быстро сокращающихся мышечных тканях. Миоглобин состоит из одной полипептидной цепи, содержащей 153 аминокислотных остатка, последовательность которых известна, и гема (комплекса железа(II) с протопорфирином). Такой же гем есть в гемоглобине — белке эритроцитов, отвечающем за перенос кислорода. Именно с наличием гема связана темная красно-коричневая окраска миоглобина и гемоглобина. Особенно много миоглобина у морских млекопитающих — китов, тюленей и дельфинов, так что их мышцы имеют коричневый цвет. Механизм хранения и распределения

миоглобина в мышцах этих животных позволяет им длительное время находиться под водой. Функции миоглобина и других глобинов более подробно рассматриваются в гл. 5.

На рис. 4-15 представлено несколько способов изображения пространственной структуры миоглобина, т. е. его третичной структуры. Красная группа внутри белка — это гем. Основная цепь молекулы миоглобина состоит из восьми относительно прямых участков α -спирали, прерываемых петлями, некоторые из них имеют структуру β -поворотов. Самая длинная α -спираль содержит 23 аминокислотных остатка, самая короткая — только 7; все спирали правые. Более 70% аминокислотных остатков миоглобина входят в состав α -спиральных участков. Рентгеноструктурный анализ позволил определить точное расположение всех R-групп, которые занимают практически все свободное место внутри свернутой молекулы белка.

На основании анализа структуры миоглобина были сделаны многие важные выводы. Положение боковых цепей аминокислотных остатков связано с гидрофобными взаимодействиями, а значит, со стабильностью структуры белка. Большинство гидрофобных R-групп сосредото-

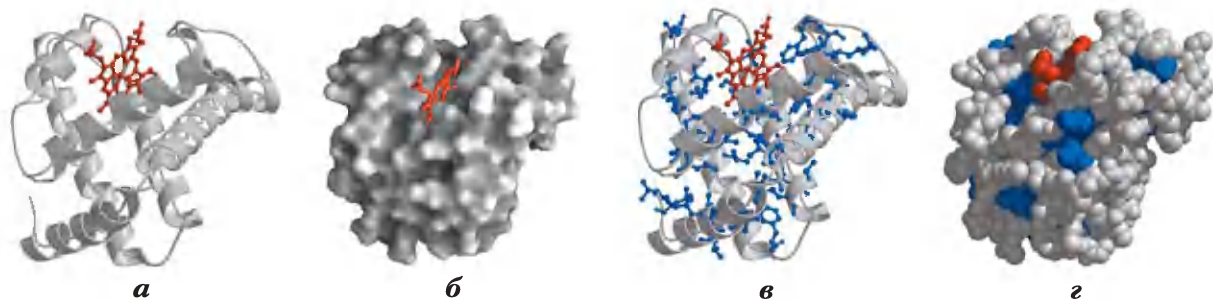


Рис. 4-15. Третичная структура миоглобина кашалота (PDB ID 1MBO). Расположение молекулы одинаково на всех рисунках; гем выделен красным цветом. Смысл данной иллюстрации состоит не только в том, чтобы познакомить читателя с самой структурой миоглобина, но и продемонстрировать различные способы изображения белковых молекул. *а)* Полипептидный остов показан в виде ленточной модели (такой тип изображения был введен Джейн Ричардсон); хорошо видны участки со вторичной структурой, в частности α -спирали. *б)* На поверхности целой молекулы можно увидеть карманы в структуре глобулы, в которых могут связываться другие молекулы. *в)* Ленточная модель, на которой показаны боковые группы (выделены синим цветом) гидрофобных аминокислотных остатков (Leu, Ile, Val и Phe). *г)* Пространственная модель с изображением боковых групп; размер каждой сферы соответствует ван-дер-ваальсову радиусу атома. Гидрофобные остатки выделены синим цветом; большинство из них скрыто в глубине молекулы белка.

чено внутри молекулы миоглобина и поэтому не контактируют с водной средой. Все полярные R-группы миоглобина, за исключением двух, находятся на внешней поверхности молекулы в гидратированном состоянии. Молекула белка настолько компактна, что внутри глобулы хватает места лишь для четырех молекул воды. Наличие такого плотного гидрофобного ядра типично для глобулярных белков. В органической жидкости доля пространства, занимаемая атомами, составляет от 0,4 до 0,6, в типичном кристалле — от 0,70 до 0,78, т. е. близко к теоретическому максимуму, а в глобулярном белке — 0,75, что сравнимо со значением в кристалле. В таком тесном контакте между атомами слабые взаимодействия значительно усиливаются. Например, неполярные боковые цепи аминокислотных остатков в гидрофобном ядре миоглобина расположены настолько близко, что действующие на коротких расстояниях ван-дер-ваальсовы взаимодействия вносят весьма заметный вклад в стабилизацию структуры.

Определение структуры миоглобина подтвердило некоторые предположения и выявило

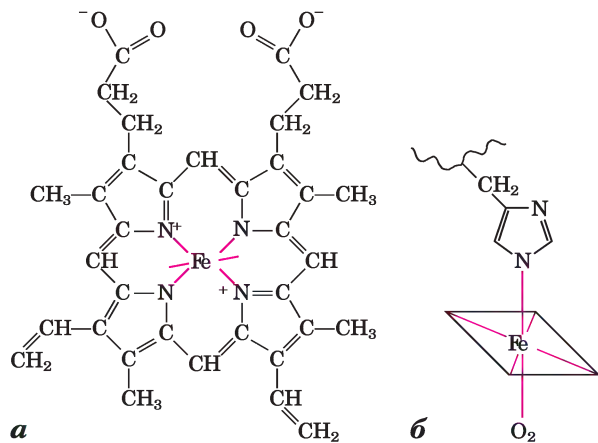


Рис. 4-16. Строение гема. Гемовая группа есть в миоглобине, гемоглобине, цитохромах и многих других белках. а) Гем представляет собой сложную полициклическую структуру (протопорфирин), с которой связан ион Fe^{2+} . Атом железа имеет шесть координационных связей, четыре из которых расположены в плоскости молекулы порфирина и связывают атом Fe с ней; две другие связи направлены перпендикулярно порфириновому кольцу. б) В миоглобине и гемоглобине одна из связей, перпендикулярных порфириновому кольцу, занята атомом азота из остатка His. Другая связь свободна и служит для связывания молекулы кислорода.

некоторые новые элементы вторичной структуры. Как предсказывали Полинг и Кори, все пептидные связи находятся в плоской *транс*-конфигурации. Именно анализ структуры миоглобина впервые экспериментально подтвердил существование α -спиралей. Три из четырех остатков Rго в миоглобине расположены в изгибах последовательности. Четвертый остаток пролина находится внутри одной α -спирали, где образует петлю, необходимую для более плотной упаковки спиралей.

Гем имеет плоскую форму и находится в щели (кармане) на молекуле миоглобина. В центре гема расположен атом железа, две координационные связи которого направлены перпендикулярно к плоскости гема (рис. 4-16). Одна из этих связей соединена с R-группой остатка His в позиции 93, другая служит для связывания молекулы кислорода. Внутри кармана доступность гема для растворителя крайне ограничена. Это очень важно, поскольку свободный гем очень быстро окисляется, в результате чего ион Fe^{2+} превращается в Fe^{3+} , а в такой форме гем не способен связывать кислород.

Поскольку изучено много различных типов структуры миоглобина, у исследователей появилась возможность наблюдать структурные изменения, сопровождающие связывание кислорода или других молекул, что позволило впервые понять и продемонстрировать связь между структурой белка и его функцией. С тех пор аналогичные исследования были проведены для сотни белков. Сегодня результаты рентгено-структурного анализа дополняются данными таких методов, как ЯМР-спектроскопия, что позволяет получить еще больший объем информации (доп. 4-5). В результате секвенирования геномов многих организмов (гл. 9) удалось идентифицировать тысячи генов, кодирующих белки с известной последовательностью, но с неизвестными пока функциями; это направление исследований стремительно развивается.

Глобулярные белки имеют разные типы третичной структуры

Из наших знаний о третичной структуре сотен глобулярных белков ясно, что в миоглобине реализуется всего лишь один из множества возможных способов свертывания полипептидной

Дополнение 4–5 **МЕТОДЫ** Методы определения трехмерной структуры белка**Метод рентгеноструктурного анализа**

Положение атомов в кристаллической решетке можно определить, измеряя положение и интенсивность пятен (точек), получаемых на фотопленке под действием рентгеновских лучей заданной длины волны после их дифракции на трехмерной кристаллической решетке изучаемого вещества. Например, рентгеноструктурный анализ кристаллов хлорида натрия показывает, что ионы Na^+ и Cl^- расположены в узлах простой кубической решетки. Подобным же образом можно определять расстояния между разными атомами в сложных органических молекулах, даже таких крупных, как белки. Но процедура анализа кристаллической структуры этих сложных молекул гораздо более трудоемкая, чем в случае неорганических солей. Если элементарной ячейкой кристаллической решетки является такая большая молекула, как белок, то многочисленные атомы дают сложную дифракционную картину с тысячами пятен (рефлексов), и здесь нужны уже компьютерные методы обработки результатов.

Дифракцию рентгеновских лучей на кристалле можно моделировать получением изображения в световом микроскопе. Свет от точечного источника фокусируют на изучаемом объекте. Свет рассеивается, проходя объект, а затем с помощью линз собирается вновь, создавая его увеличенное изображение. Минимальный размер объекта, который можно исследовать с помощью светового микроскопа, определяется длиной вол-

ны видимого света (от 400 до 700 нм). Объекты, размер которых меньше половины длины волны падающего света, не видны в микроскоп. Для изучения таких мелких объектов, как молекулы белка, нужно использовать рентгеновские лучи с длиной волны от 0,7 до 1,5 Å (0,07–0,15 нм). Однако не существует линз, способных собирать рентгеновские лучи для получения изображения; в данном случае приходится напрямую изучать дифракционную картину и восстанавливать изображение с помощью математических методов.

Объем информации, извлекаемой из данных рентгеноструктурного анализа, зависит от упорядоченности структуры образца. Уже самые первые исследования дифракции фибриллярных белков волос и шерсти, имеющих достаточно регулярную организацию, позволили получить некоторые важные структурные параметры. Однако пучки фибриллярных белков не образуют кристаллов: молекулы белка вытянуты параллельно друг другу, но они не ориентированы в одном направлении. Более детальную информацию о трехмерной структуре молекул белка можно получить только на кристаллических образцах. Кристаллизация белков — это в некотором смысле искусство эксперимента, а не наука, и структуры многих белков до сих пор неизвестны по той простой причине, что пока не удается получить их в кристаллическом виде. Практики сравнивают выращивание монокристалла белка с попыткой связать несколько шаров для боулинга с помощью скотча.

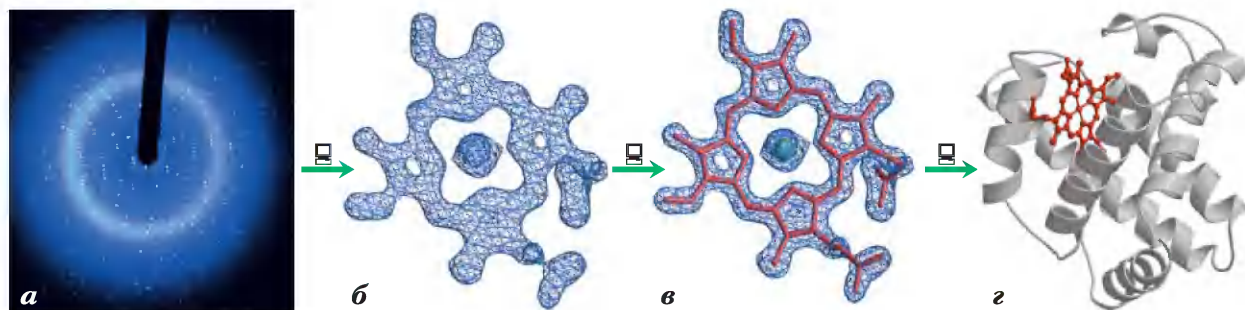


Рис. 1. Определение структуры миоглобина кашалота методом рентгеноструктурного анализа. *а*) Получение дифрактограммы кристаллического образца белка. *б*) Расчет карты электронной плотности белка на основании дифракционной картины. Здесь показана карта электронной плотности только части молекулы — ее гема. *в*) Участки наибольшей электронной плотности указывают на расположение атомных ядер; на основании этой информации воссоздается полная картина — модель структуры гема по карте его электронной плотности. *г*) Полная структура гемосодержащего миоглобина кашалота (PDB ID 2MBW).

Проведение самого рентгеноструктурного анализа осуществляется в несколько этапов (рис. 1). Кристалл помещают между источником рентгеновского излучения и детектором и получают регулярный набор пятен, которые называются рефлексами и возникают как результат дифракции пучка рентгеновских лучей на атомах, причем каждый атом в молекуле образца вносит свой вклад в расположение каждой точки. С помощью математического метода, основанного на преобразовании Фурье, из дифракционной картины получают карту электронной плотности белка. В данном случае компьютер выступает в роли «вычислительной линзы». Затем на основании карты электронной плотности создают модель структуры белка.

Джон Кендрию обнаружил, что в случае кристаллического миоглобина (выделенного из мышц кашалота) рентгеновская дифрактограмма очень сложная, на ней 25 000 рефлексов. Компьютерный анализ этой картины осуществляли поэтапно. На каждом этапе разрешение улучшалось, и наконец, к 1959 г. было определено положение практически всех атомов белка (кроме атомов водорода). Аминокислотная последовательность белка, полученная методами химического анализа, совпадала с молекулярной моделью. С тех пор были определены структуры тысяч белков, некоторые из них имеют гораздо более сложное строение, чем миоглобин.

Окружение атомов и молекул в кристалле, безусловно, отличается от окружения в растворе или в живой клетке. В модели, полученной методом рентгеноструктурного анализа кристалла, пространственные и временные параметры структуры усредняются. Рентгеноструктурный анализ почти ничего не говорит о конформациях, которые молекула белка может принимать в растворе. На конформацию белка в кристаллическом состоянии, в принципе, могут также оказывать влияние нефизиологические факторы, такие как случайные белок-белковые взаимодействия. Поэтому данные структурного анализа кристаллов сравнивают с данными, полученными другими методами (например, методом ЯМР, описанным ниже). При этом почти всегда выясняется, что структура молекулы, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа, соответствует функциональной конформации белка. Рентгеноструктурный анализ может успешно применяться для изучения белков, размеры которых слишком велики для исследования методом ЯМР.

Метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР)

Преимущество метода ЯМР состоит в том, что исследование осуществляется в растворе, тогда как рентгеноструктурный анализ применим только к тем объектам, которые удается кристаллизовать. Кроме того, методом ЯМР можно выявить динамические изменения в структуре белка, в том числе конформационные изменения, фолдинг и взаимодействие с другими молекулами.

ЯМР напрямую связан с вектором ядерного магнитного момента — квантовомеханической характеристики атомных ядер. Только некоторые атомы, в том числе ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F и ^{31}P , имеют ядра, дающие сигнал ЯМР. (Все эти атомы имеют спиновое квантовое число $1/2$. — *Прим. ред.*) Ядерный спин создает магнитный диполь. Если раствор, содержащий макромолекулы одного типа, поместить в сильное постоянное магнитное поле, молекулярные диполи выстраиваются в этом поле в одной из двух возможных ориентаций — по направлению (с низким уровнем энергии) или против направления (с высоким уровнем энергии) поля. Диполи, выстроенные в магнитном поле, облучают под прямым углом короткими (~10 мкс) электромагнитными импульсами подходящей частоты (резонансной частоты, находящейся в диапазоне радиочастот). Ядра поглощают некоторое количество энергии и переходят в состояние с более высоким уровнем энергии, причем спектр поглощения содержит информацию о типах ядер и окружении, в котором они находятся. Данные многих подобных экспериментов усредняют, добиваясь максимально-

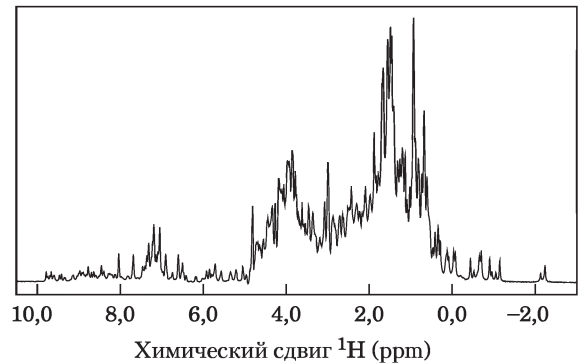


Рис. 2. Одномерный спектр ЯМР глобина морского червя. Этот белок очень близок по структуре к миоглобину кашалота; оба белка относятся к одному структурному семейству и отвечают за транспорт кислорода.

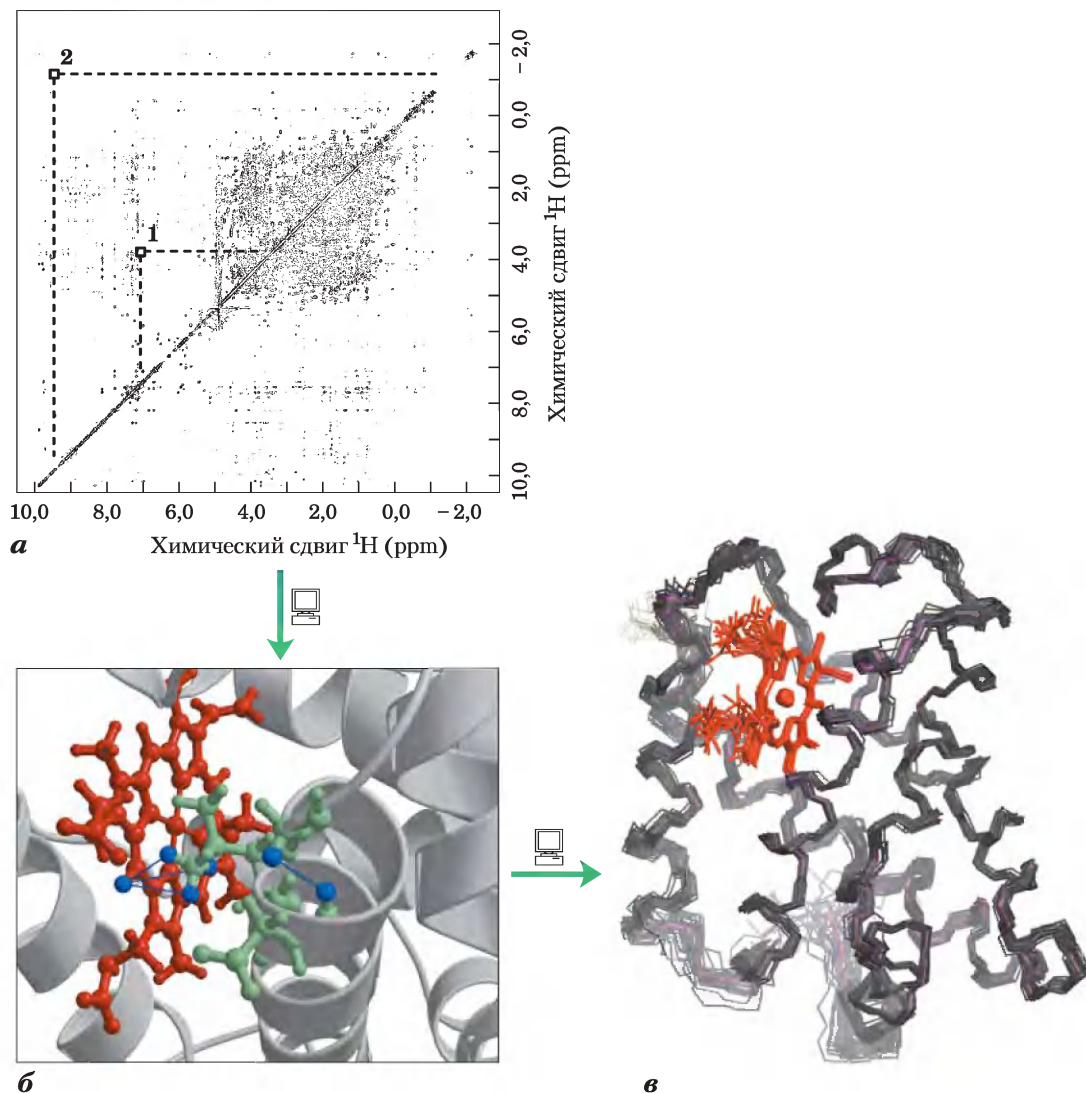


Рис. 3. Метод двумерной спектроскопии ЯМР для получения трехмерной структуры глобина (того же белка, что использовался для получения спектра на рис. 2). Диагональ двумерного спектра ЯМР эквивалентна одномерному спектру. Пики, лежащие вне диагонали, соответствуют сигналам ЯЭО, возникшим в результате взаимодействия расположенных близко друг к другу атомов ^1H , сигналы которых в одномерном спектре могут быть достаточно удалены друг от друга. На рисунке (а) идентифицированы два таких взаимодействия; они показаны на рисунке (б) синими линиями (PDB ID 1VRF). Взаимодействие между метильной группой белка и водородом гема изображено с помощью трех линий. Метильная группа быстро вращается, так что все три ее атома водорода вносят одинаковый вклад во взаимодействие и в сигнал ЯМР. Эта информация использована для построения полной трехмерной структуры белка, приведенной на рисунке (в) (PDB ID 1VRE). Множественные линии, изображающие полипептидный остов белка, демонстрируют серию структур, согласующихся с ограничениями межатомных расстояний, определенными методом ЯМР. Структурное сходство этого белка с миоглобином (рис. 1) очевидно. На обоих рисунках белки ориентированы одинаковым образом.

го увеличения отношения сигнал/шум, и получают спектр ЯМР такого типа, как показан на рис. 2.

Особенно важную роль в методе ЯМР играют сигналы от атомов ^1H , что связано с их высокой чувствительностью и высоким содержанием в образцах. Однако протонный (^1H) спектр ЯМР макромолекул может оказаться слишком сложным. Даже небольшой белок содержит сотни атомов ^1H , что обычно делает невозможным анализ одномерного спектра ЯМР. Структурный анализ белков стал возможен с развитием метода двумерной спектроскопии ЯМР (рис. 3). Этот метод позволяет определять зависимые от расстояния диполь-дипольные взаимодействия между спинами сближенных в пространстве атомов (измерение ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) в двумерном эксперименте NOESY), а также спин-спиновые взаимодействия атомов, связанных ковалентными связями (метод TOCSY).

Построение полной трехмерной структуры на основании двумерного спектра ЯМР может оказаться очень трудоемкой задачей. Величины ЯЭО дают некоторую информацию о расстояниях между отдельными атомами, но чтобы использовать эту информацию, каждый сигнал необходимо отнести к определенному атому. Какие сигналы ЯЭО соответствуют атомам, связанным ковалентными связями, можно узнать с помощью дополнительных экспериментов с использованием метода TOCSY. Определенные сигналы в ЯЭО-спектре удается связать с наличием вторичной структуры белка, такой как α -спираль. Современные методы геной инженерии

(гл. 9) позволяют создавать белки, содержащие изотопы ^{13}C или ^{15}N . Сигналы ЯМР, связанные с наличием этих атомов, в сочетании с сигналами, возникающими в результате их взаимодействия с ^1H , позволяют выявить сигналы отдельных протонов. Это легче сделать, если известна аминокислотная последовательность белка.

Для воспроизведения трехмерной структуры белка в компьютерную программу закладывают значения межатомных расстояний, а также такие известные геометрические параметры, как хиральность, ван-дер-ваальсовы радиусы, длины и углы связей. На основании этих данных компьютер создает серию структур, отражающих возможный диапазон конформационных состояний молекулы с учетом ограничений межатомных расстояний, полученных из данных ЯЭО (рис. 3, в). Некоторая неоднозначность структур, созданных на основе результатов ЯМР, частично отражает колебания внутри белковой молекулы в растворе, которые будут подробнее обсуждаться в гл. 5. Известная неопределенность проистекает также из ошибок эксперимента.

Обычно структуры белка, определенные с помощью рентгеноструктурного анализа и ЯМР, подтверждают друг друга. Иногда возможны расхождения в локализации боковых цепей отдельных аминокислотных остатков на поверхности белка, что часто связано с типом упаковки соседних молекул белка в кристалле. Эти два метода являются основным источником быстро растущего объема информации о структуре макромолекул в живых клетках.

цепи. В табл. 4-3 приведено относительное содержание аминокислотных остатков, входящих в состав α -спиральных участков и участков с β -конформацией, для нескольких небольших глобулярных белков, состоящих из одной полипептидной цепи. Каждый из этих белков имеет характерную структуру, адаптированную для выполнения специфической биологической функции, однако у них есть важные общие свойства. Каждый белок образует компактную структуру, причем гидрофобные боковые цепи ориентированы внутрь глобулы (подальше от воды), а гидрофильные боковые цепи расположены на поверхности. Все структуры стабилизированы с помощью множества водородных связей и некоторых ионных взаимодействий.

Для первого знакомства с очень сложной третичной структурой глобулярных белков, размеры которых гораздо больше размеров миоглобина, полезно обратить внимание на несколько типов структур, встречающихся в самых разных, часто вовсе не связанных между собой белках. Трехмерную структуру типичного глобулярного белка можно представить как набор полипептидных сегментов, уложенных в виде α -спиралей или β -слоев и соединенных друг с другом связующими последовательностями. Следующим шагом является описание того, как эти сегменты соединены друг с другом и как организованы связующие последовательности.

Понимание трехмерной структуры белка в целом строится на анализе структуры отдельных

Таблица 4-3

Приблизительное содержание аминокислотных остатков в α -спиралях и участках с β -конформацией в некоторых одноцепочечных белках

Белок (общее число остатков)	Остатки (%)*	
	α -Спирали	β -Конформация
Химотрипсин (247)	14	45
Рибонуклеаза (124)	26	35
Карбоксипептидаза (307)	38	17
Цитохром с (104)	39	0
Лизоцим (129)	40	12
Миоглобин (153)	78	0

Источник: данные взяты из книги Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part I: The conformation of biological macromolecules*, p. 100, W.H. Freeman and Company, New York.

* Участки полипептидных цепей, не образующих ни α -спирали, ни β -конформацию, представляют собой изгибы цепи и нерегулярно скрученные или вытянутые отрезки. Участки α -спиралей и β -конформации иногда имеют слегка искаженные размеры и геометрию, отличающиеся от соответствующих нормальных параметров.

его участков. Мы начнем с определения двух важных терминов, использующихся для описания отдельных участков или элементов структуры полипептидной цепи, а затем обратимся к закономерностям укладки (фолдинга) белка.

Первый термин — это **супервторичная структура** белка, иначе называемая **белковым мотивом**; эта структура определяет устойчивое взаиморасположение определенных элементов вторичной структуры и связующих их последовательностей. Приведенные термины синонимичны, хотя в литературе наблюдается некоторая путаница с их употреблением. Белковые мотивы могут быть очень простыми, например два элемента вторичной структуры, расположенные друг напротив друга, и составлять лишь малую часть белка. Пример таких элементов — **β - α - β -петли** (рис. 4-17, а). Мотив может быть очень замысловатой структуры и содержать множество участков белка, упакованных в единую структуру, например β -бочонок (рис. 4-17, б). Иногда целый белок может являться одним большим мотивом. Этот термин отражает все преимущества представления белка в виде отдельно упакованных участков и хорош для описания таких участков. Участок, определенный как мотив, иногда бывает устойчивой самостоятель-

ной структурой. Мы уже сталкивались с одним хорошо изученным мотивом — суперспиралью α -кератина, которая встречается и в ряде других белков. Обратите внимание, что мотив — это не промежуточный уровень структуры белка между вторичной и третичной структурами. Это участок укладки, который описывает малую часть белка или отдельную полипептидную цепь. Синоним «супервторичная структура» несколько запутывает, так как подразумевает наличие определенной иерархии.

Второй термин, используемый для описания структуры белка, это **домен**. Согласно определению, предложенному Джейн Ричардсон в 1981 г., домен — это часть полипептидной цепи, которая стабильна вне зависимости от остальной цепи или может перемещаться относительно целого белка как самостоятельная единица. Полипептиды, имеющие в своем составе несколько сотен аминокислотных остатков, часто состоят из двух или более доменов, которые могут различаться по функциям. Во многих случаях домены крупного белка сохраняют свою нативную трехмерную структуру даже при отделении от другой части белка, например, в результате протеолитического расщепления. Иногда домены в мультидоменных белках удается различить как отдельные структурные единицы (рис. 4-18), но чаще этого сделать нельзя из-за тесного контакта между ними. Отдельные домены часто выполняют различные функции, такие как связы-

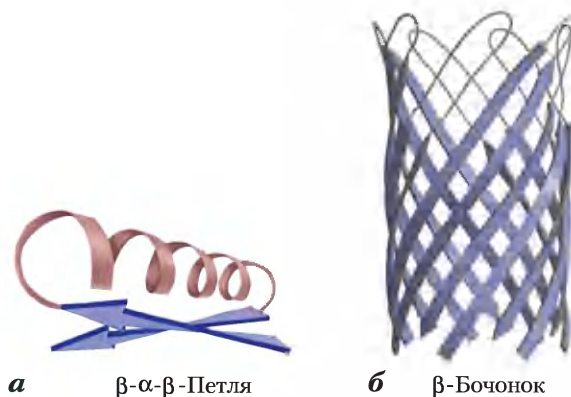


Рис. 4-17. Мотивы. а) Простой мотив — β - α - β -петля. б) Более сложный мотив — β -бочонок. Этот β -бочонок является единственным доменом α -гемоллизина (токсина бактерии *Staphylococcus aureus*, уничтожающего бактерии путем создания пор в клеточных мембранах) (PDB ID 7AHL).

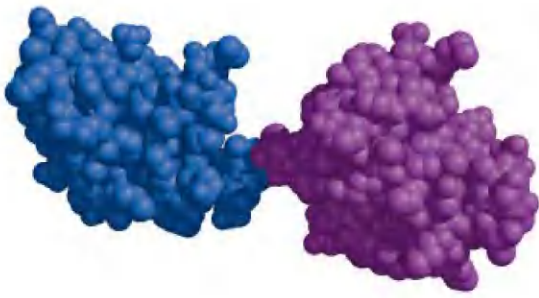


Рис. 4-18. Структурные домены в полипептидной цепи тропонина С (PDB ID 4TNC). Данный кальций-связывающий белок мышечной ткани содержит отдельные домены для связывания кальция, выделенные на рисунке разными цветами.

вание небольших молекул или взаимодействие с другими белками. Маленькие белковые молекулы обычно состоят из одного домена (т. е. домен представляет собой *весь* белок).

Сворачивание белков (фолдинг) подчиняется ряду физических и химических закономерностей. Перечислим некоторые из них, поскольку они позволяют определить несколько простых белковых мотивов.

1. Гидрофобные взаимодействия вносят значительный вклад в устойчивость структуры белка. Необходимость спрятать R-группы гидрофобных аминокислот, чтобы исключить их контакт с водой, влечет за собой возникновение, по крайней мере, двух уровней вторичной структуры. Такие два уровня могут создаваться простыми мотивами, например β - α - β -петлями (рис. 4-17, а).

2. Если в белках существуют как α -спирали, так и β -слои, то они обычно расположены в разных частях структуры. Это правило объясняется тем, что полипептидный участок с β -конформацией (рис. 4-6) не может участвовать в образовании водородных связей с находящейся рядом α -спиралью.

3. Полипептидные участки, расположенные рядом в последовательности аминокислот, обычно оказываются по соседству и в свернутом белке. Хотя удаленные участки последовательности в результате образования третичной структуры также могут соприкоснуться, это происходит нечасто.

4. Связующие последовательности между элементами вторичной структуры не пересекаются и не образуют узлов (рис. 4-19, а).

5. β -Конформация оказывается более устойчивой, если ее отдельные участки слегка скручены вправо. Это влияет на расположение как обоих листов относительно друг друга, так и полипептидного связующего отрезка между ними. Например, два параллельных β -слоя должны перекрещиваться (рис. 4-19, б). В принципе,

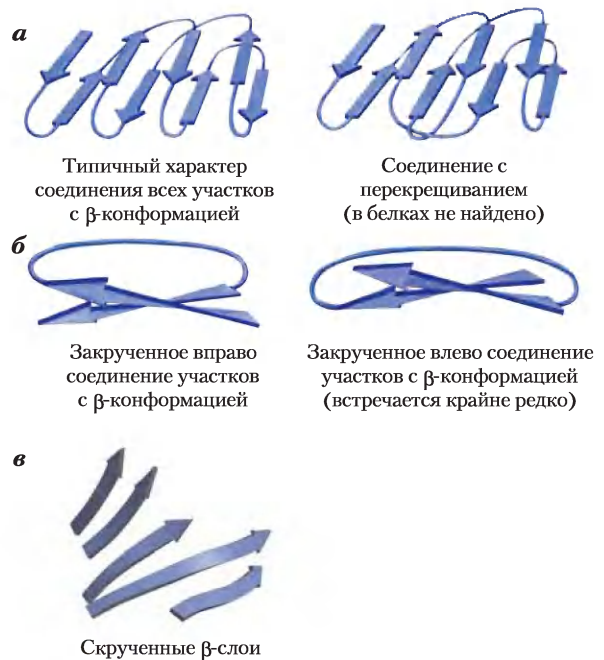


Рис. 4-19. Устойчивые типы укладки полипептидной цепи в белках. а) Связь между участками цепи с β -конформацией в уложенных β -слоях. Цепи показаны с одного конца, изгибы структуры не отражены. Более толстыми линиями обозначены связующие последовательности, расположенные ближе к читателю, более тонкими линиями — те, что расположены на дальней стороне β -слоя. Связующие последовательности с каждой стороны β -слоя (как с ближней к читателю, так и с дальней от него стороны) не пересекаются между собой. б) Участки с β -конформацией скручиваются, поэтому связывающие их последовательности обычно закручены вправо. Закрученные влево структуры должны образовывать более острые углы, поэтому они труднее образуются. в) Скрученные β -слои — это структура домена фототелиазы (фермента, ответственного за репарацию некоторых типов повреждений ДНК) из *E. coli* (PDB ID 1DNP). Для наглядности изображения укладки β -слоев соединяющие петли не показаны.

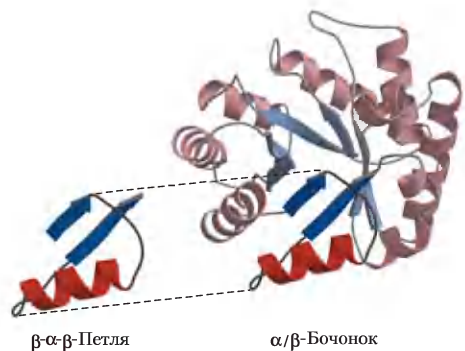


Рис. 4-20. Построение более крупного мотива из более мелких. $\alpha\beta$ -Бочонок – это распространенный мотив из повторяющихся мотивов β - α - β -петель. Изображен домен гликолитического фермента пируваткиназы кролика (PDB ID 1PKN).

такая перекрестная структура может быть повернута как вправо, так и влево, но в белках почти всегда реализуется правая конформация. Правая связующая последовательность обычно короче левой и изогнута под меньшим углом, поэтому она легче образуется. Скрученность β -слоев, кроме того, приводит к характерным изгибам структуры, образующейся при контакте большого числа таких участков. Примерами могут служить β -бочонок (рис. 4-17, б) и скрученные β -слои (рис. 4-19, в), которые образуют ядро многих более крупных структур.

Более сложные белковые мотивы могут строиться из простых в соответствии с данными правилами. Например, серия β - α - β -петель, организованных так, что участки с β -конформацией формируют бочонок, образует очень устойчивый и распространенный мотив, называемый **$\alpha\beta$ -бочонком** (рис. 4-20). В этой структуре каждый из параллельных β -слоев связан с соседним с помощью α -спирального участка. Все связующие последовательности закручены вправо. $\alpha\beta$ -Бочонок обнаружен во многих ферментах, причем участок связывания кофактора или субстрата часто находится в кармане, расположенном у одного из концов бочонка. Обратите внимание, что структуры со сходным способом укладки полипептидной цепи принято считать одинаковыми мотивами, даже если входящие в их состав α -спирали и β -слои имеют разную протяженность.

Белковые мотивы — основа классификации белковых структур

Архитектура белка — третичная структура больших глобулярных белков, IV. Структурная классификация белков. Как вы могли заметить, изучение третичной структуры белка несколько упрощается, если принять во внимание наличие во многих белках характерных элементов (подструктур). Развивая такой подход к анализу белков, ученые организовали содержимое баз данных о белковых структурах в соответствии с иерархическими уровнями организации белков. База данных SCOP (*Structural Classification of Proteins*), содержащая информацию о структурной классификации белков, является примером этого крайне важного направления в биохимии. Для самого высокого уровня классификации база данных SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>) использует уже широко известную схему, в соответствии с которой все белковые структуры делятся на четыре класса: полностью α , полностью β , α/β (участки с α - и β -структурой рассеяны по последовательности или чередуются) и $\alpha + \beta$ (участки с α - и β -структурой каким-то образом разделены и группируются с себе подобными). К каждому классу относятся от десятков до сотен различных типов укладки, имеющих различные типы подструктуры, и число их постоянно растет. Некоторые типы подструктуры встречаются очень часто, другие пока обнаружены в одном единственном белке. На рис. 4-21 приведены примеры белковых мотивов, встречающихся в белках четырех названных классов. И это лишь небольшая часть из сотен известных мотивов. Но число вариантов укладки белковой цепи бесконечно. Хотя скорость появления новых белковых структур постоянно растет, рост числа новых идентифицируемых мотивов сокращается. Всего в белках реализуется не более 1000 различных типов укладки или мотивов. Из рис. 4-21 видно, как могут быть организованы белки с разными мотивами. Два верхних уровня организации белковых структур — **классы** и **мотивы** — касаются исключительно структуры белка. Ниже этих уровней классификация строится на эволюционных закономерностях.

В белках встречается множество примеров доменов или мотивов. Это означает, что третичная структура белка более консервативна,

чем его первичная структура. Таким образом, сопоставление белковых структур может способствовать получению важной информации о ходе эволюции. Белки, имеющие значительное сходство первичной структуры и (или) очевидное сходство структуры и функций, относят к одному и тому же **семейству белков**. Внутри семейства белков обычно прослеживается явное эволюционное родство. Например, семейство

глобинов содержит большое количество белков, каждый из которых похож на миоглобин как по структуре, так и по аминокислотной последовательности (см. доп. 4-5 и гл. 5). Белки двух или нескольких семейств, имеющие мало сходства в первичных структурах, но содержащие одинаковые пространственные структурные мотивы и близкие по функциям, объединяют в **суперсемейства**. Возможно, что между семейства-

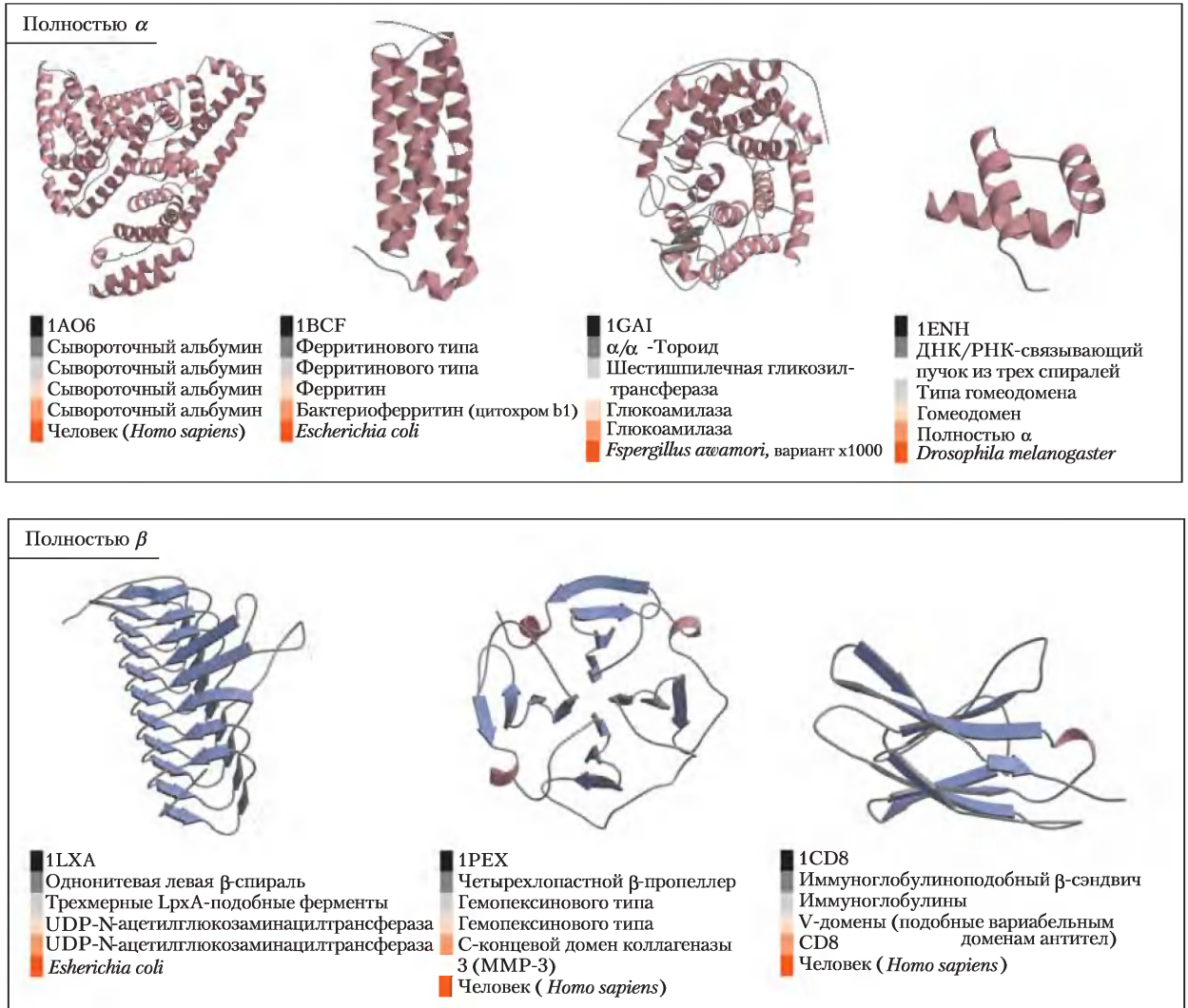


Рис. 4-21. Классификация белков на основании структурных мотивов. Здесь представлена лишь небольшая часть из сотен известных стабильных мотивов, которые разделены на четыре класса: только α , только β , α/β и $\alpha + \beta$. Кроме того, приводятся данные классификации SCOP (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/>) (см. цветовой код) и идентификационные номера из банка данных PDB (www.rcsb.org) (верхняя строка при каждой структуре). Изображенный на рис. 4-20 $\alpha\beta$ -бочонок является еще одним примером белка со структурой α/β .

(Продолжение рис. 4.21 на следующей странице)

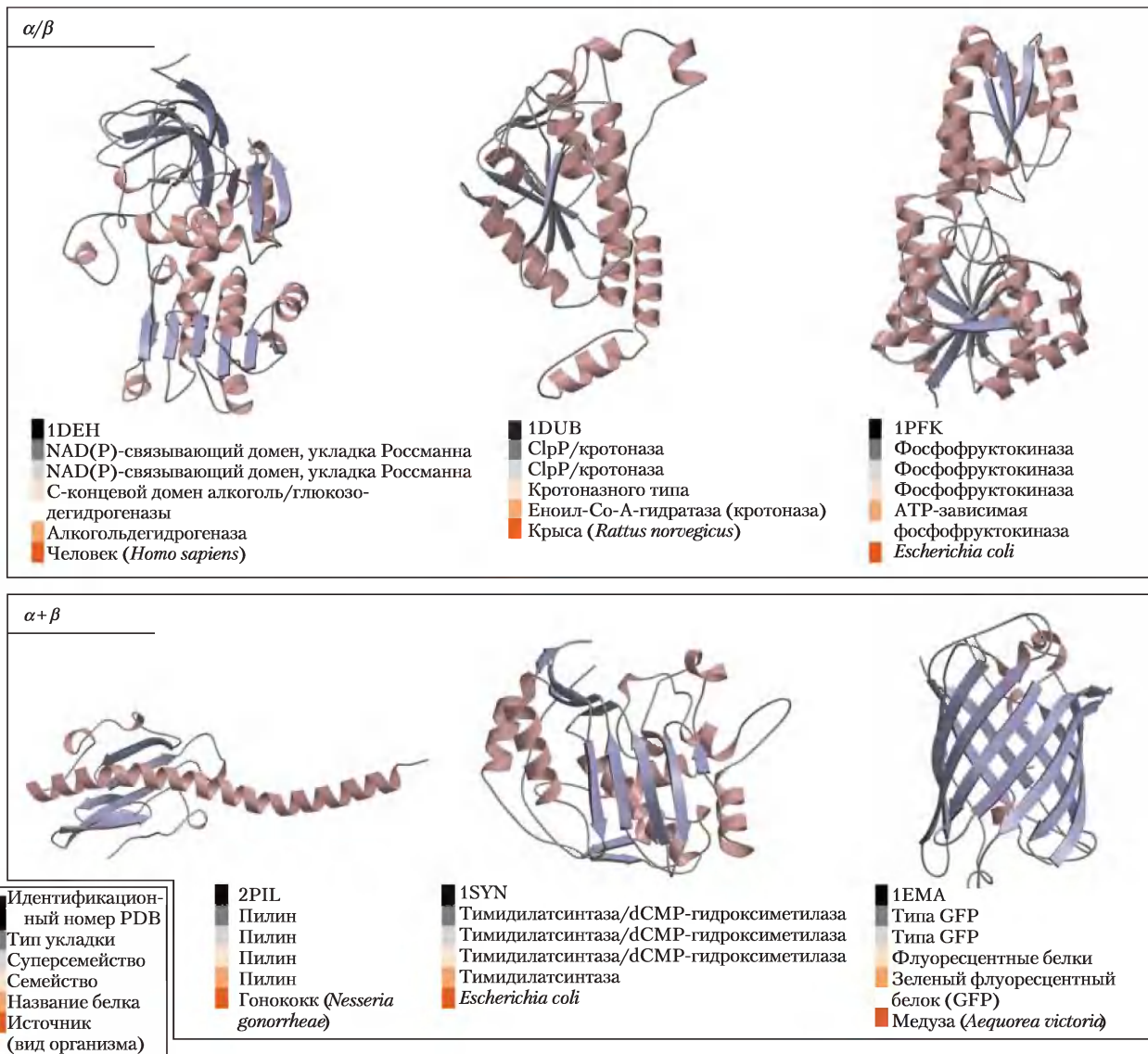


Рис. 4-21. (Продолжение)

ми внутри одного суперсемейства существует определенное эволюционное родство, даже если время и функциональные различия (а значит, различное адаптивное воздействие) стерли сходство последовательностей. Если белки одного семейства найдены во всех трех высших таксонах живых организмов — в бактериях, археях и эукариотах, это говорит об очень древнем происхождении семейства. Другие семейства могут распространяться лишь на небольшую группу организмов, что говорит о более позднем происхождении. Прослеживая историю структурных

мотивов с привлечением баз данных, таких как SCOP, можно получить много полезной информации относительно эволюционных связей белков. База данных SCOP пополняется вручную, причем белки размещаются в соответствии с их происхождением на основании консервативных элементов структуры.

Структурные мотивы очень важны для описания семейств и суперсемейств белков. Совершенствование системы классификации неизбежно привело к выявлению новых функциональных связей. Учитывая важную роль белков для живых

организмов, подобный сравнительный анализ структур может пролить свет на многие аспекты биохимии — от эволюции отдельного белка до эволюции целых метаболических путей.

Некоторые ресурсы и базы данных, работающие в режиме реального времени, дополняют базу SCOP. База данных CATH (*class, architecture, topology, and homologous superfamily*) позволяет поместить белок в банк белковых структур PDB в соответствии с четырехуровневой иерархией. Другие программы позволяют пользователю ввести в программу интересующий его белок и найти в банке PDB другие белки, которые имеют с ним определенное сходство. Среди таких программ можно назвать VAST (*vector alignment search tool*), CE (*combinatorial extension of the optimal paths*) и FSSP (*fold classification based on structure-structure alignment of proteins*).

Четвертичная структура белка варьирует от простых димеров до больших комплексов

Архитектура белка — четвертичная структура. Многие белки состоят из нескольких полипептидных субъединиц, которые могут выполнять несколько разных функций. Некоторые мультисубъединичные белки несут регуляторную функцию; связывание небольших молекул может влиять на взаимодействие между субъединицами и вызывать значительные изменения в активности белка в ответ на малые изменения концентраций субстратов или регуляторных молекул (гл. 6). Отдельные субъединицы могут иметь разные, но связанные между собой функции, например катализ и регуляцию. Комплексы фибриллярных белков, обсуждавшиеся ранее в данной главе, или белки оболочки вируса выполняют структурную функцию. Некоторые очень крупные белковые комплексы участвуют в осуществлении многостадийных процессов. Примером являются рибосомы, осуществляющие биосинтез белка и состоящие из десятков белковых субъединиц и нескольких молекул РНК.

Мультисубъединичные белки часто называют **мультимерами**. Мультимер, состоящий всего из нескольких субъединиц, называют **олигомером**. Если мультимерный белок содержит различные субъединицы, то его общая структура может быть асимметричной и достаточно сложной. Однако большинство белков состоят

из идентичных субъединиц или повторяющихся групп неидентичных субъединиц и обычно имеют симметричное строение. Как говорилось в гл. 3, повторяющиеся структурные единицы в таких мультисубъединичных белках называют **протомерами**, вне зависимости от того, идет ли речь о единственной субъединице или о группе субъединиц. Иногда для обозначения отдельных субъединиц протомера используют греческие буквы.

Первым олигомерным белком, чью трехмерную структуру удалось установить, был гемоглобин (64 500), состоящий из четырех полипептидных цепей и четырех гемов с атомами железа в форме Fe^{2+} (рис. 4-16). Белковая часть гемоглобина, называемая глобином, состоит из двух α -субъединиц (по 141 остатку в каждой) и двух β -субъединиц (по 146 остатков). Обратите внимание, что в данном случае обозначения α и β не имеют отношения к вторичной структуре. Поскольку гемоглобин в четыре раза крупнее миоглобина, на определение его трехмерной структуры методом рентгеноструктурного анализа было потрачено гораздо больше времени и сил. Структура гемоглобина была расшифрована Максом Перутцем, Джоном Кендрю и их коллегами в 1959 г. Субъединицы гемоглобина расположены симметричными парами (рис. 4-22): в каждой паре есть одна α - и одна β -субъединицы. Таким образом, гемоглобин можно считать либо тетрамером, либо димером $\alpha\beta$ -протомеров.

Идентичные субъединицы мультимерных белков обычно организованы в симметричные структуры. Для обсуждения этих структур необходимо объяснить некоторые термины, использу-



Макс Перутц, 1914–2002 (слева), Джон Кендрю, 1917–1997

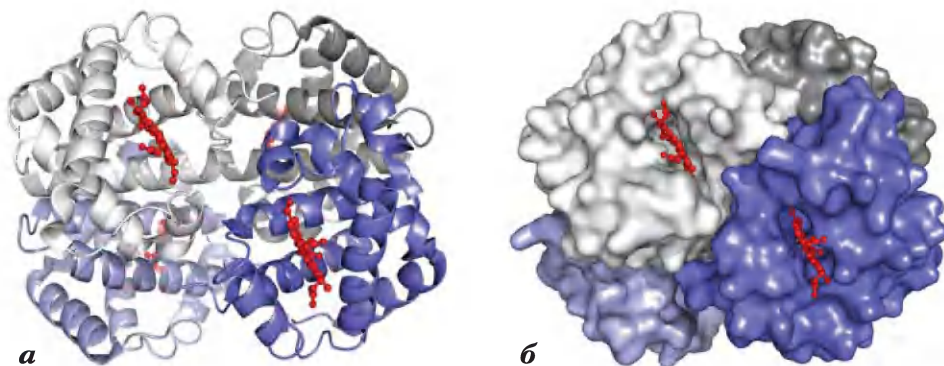
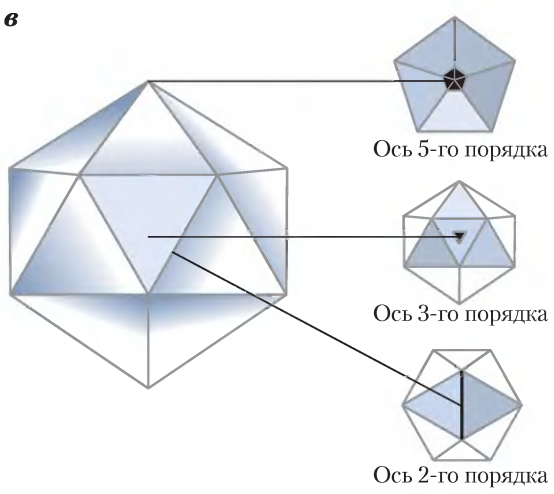
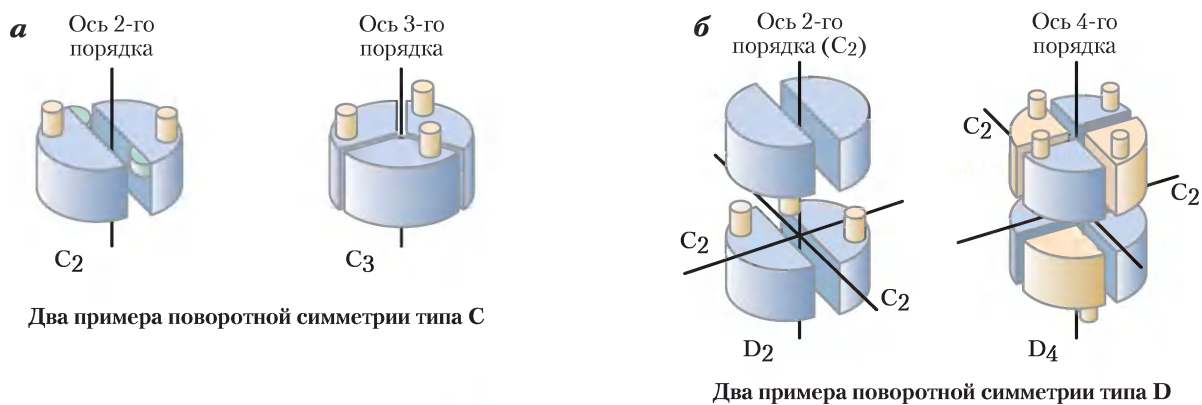


Рис. 4-22. Четвертичная структура дезоксигемоглобина (PDB ID 2HHB). Рентгеноструктурный анализ дезоксигемоглобина (гемоглобин без связанных с гемом молекул кислорода) позволяет понять, как расположены в пространстве четыре субъединицы белка. а) Ленточная модель. б) Модель поверхности. α -Субъединицы показаны серым цветом, β -субъединицы — оттенками синего. Обратите внимание, что гемовые группы (красного цвета) удалены друг от друга на относительно большое расстояние.



Оси симметрии в икосаэдре

Рис. 4-23. Вращательная симметрия в белках. а) В случае поворотной симметрии типа C субъединицы можно совместить путем поворота вокруг одной оси n -го порядка, где n — это число связанных таким образом субъединиц. Черные линии — оси симметрии; порядок оси указан в нижнем индексе. Показаны только две из возможных структур с симметрией C_n . б) В случае поворотной симметрии типа D субъединицы могут быть совмещены в результате вращения относительно одной или двух осей, причем одна из двух — это ось 2-го порядка. Наиболее часто встречается симметрия типа D_2 . в) Икосаэдрическая симметрия. Для совмещения всех 20 треугольных граней икосаэдра необходимо вращение вокруг одной или большего числа осей симметрии — 2, 3 и 5-го порядка. Слева показан икосаэдр с перпендикулярными осями разного порядка.

емые при описании симметрии. Олигомеры могут иметь **поворотную симметрию** или **винтовую (спиральную) симметрию**. Это означает, что одну субъединицу можно наложить на другую (до точного совпадения) либо путем вращения вокруг одной или нескольких осей, либо в результате поворота и сдвига (поворота по спирали). В белках с поворотной осью симметрии субъединицы располагаются вокруг оси вращения и образуют замкнутые структуры. Белки со спиральной осью симметрии образуют более открытые структуры, в которых субъединицы выстраиваются одна за другой по спирали.

Существует несколько типов поворотной симметрии. Простейший вариант описывается **циклическими группами симметрии C_n** : при повороте вокруг одной из осей симметричные объекты накладываются (рис. 4-23, а). (С означает циклическая, а n указывает на число субъединиц, связанных осью вращения.) Сама ось называется осью вращения n -го порядка. Таким образом, $\alpha\beta$ -протомеры гемоглобина (рис. 4-22) связаны с осью симметрии C_2 . Несколько более сложной является **симметрия, описываемая группами D_n** (их иногда называют **диэдрическими**). В этом случае оси второго порядка пересекают ось n -го порядка под прямыми углами (рис. 4-23, б). Белок с симметрией D_n имеет $2n$ протомеров.

Белки с симметрией C_n или D_n встречаются наиболее часто. Возможны и другие типы поворотной симметрии, но лишь немногие из них обнаружены в белках. В качестве примера можно привести **икосаэдрическую симметрию**. Икосаэдр — это правильный двенадцативершинный многогранник с 20 равносторонними треугольными гранями (рис. 4-23, в). Каждую грань можно совместить с остальными путем поворота вокруг одной или большего числа осей трех порядков. Такую структуру очень часто имеет оболочка вируса — капсид. Возбудитель полиомиелита человека (полиовирус) имеет капсид такого строения (рис. 4-24, а). Каждая треугольная грань составлена из трех протомеров, содержащих по одной копии четырех различных полипептидных цепей, три из которых находятся на внешней поверхности капсида. Шестьдесят протомеров образуют 20 сторон оболочки в форме икосаэдра, внутри которой хранится генетический материал (РНК).

Винтовая симметрия, встречающаяся в олигомерных белках, тоже была обнаружена в капсидах. Вирус табачной мозаики представляет собой правозакрученную спираль, состоящую из 2130 идентичных субъединиц (рис. 4-24, б). Внутри такой цилиндрической структуры содержится РНК вируса. Белки, состоящие из расположенных по спирали субъединиц, также могут формировать протяженные нитевидные структуры, такие как актиновые филаменты в мышцах (рис. 5-28).

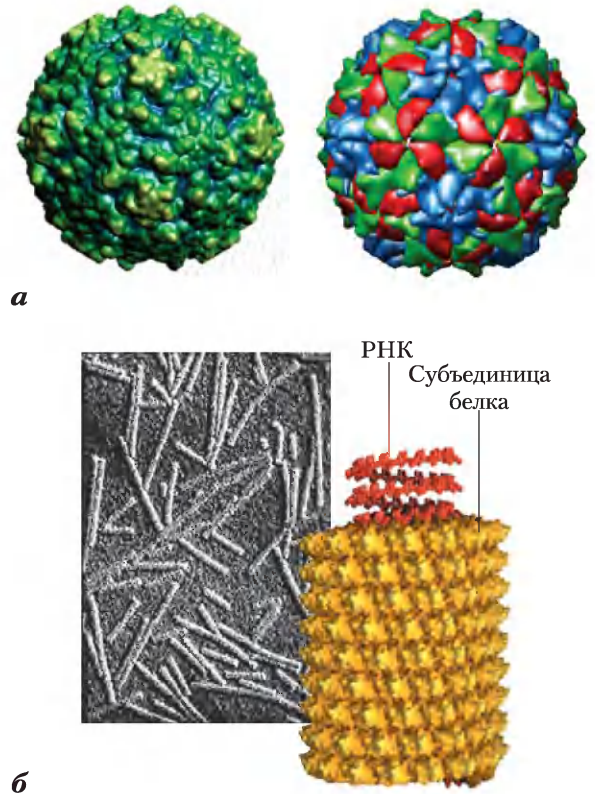


Рис. 4-24. Капсиды вирусов. а) Полиовирус (PDB ID 2PLV), как он представлен в базе структурной вирусологии VIPER. Белки на поверхности полиовируса собраны в виде икосаэдра диаметром 300 Å. Икосаэдрическая симметрия — один из видов вращательной симметрии (рис. 4-23, в). Слева — поверхность капсида полиовируса; справа — та же поверхность при более низком разрешении; субъединицы белков капсида раскрашены, чтобы показать икосаэдрическую симметрию. б) Вирус табачной мозаики (PDB ID 1VTM). Этот вирус имеет форму палочки (как показано на электронной микрофотографии) длиной 3000 Å и диаметром 180 Å и обладает спиральной симметрией.

Краткое содержание раздела 4.3

ТРЕТИЧНАЯ И ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРЫ БЕЛКА

- Третичная структура представляет собой полную пространственную структуру полипептидной цепи. На основании третичной структуры белки делятся на два больших класса — фибриллярные и глобулярные.
- Фибриллярные белки, обычно выполняющие структурные функции, как правило, включают простые повторяющиеся элементы вторичной структуры.
- Глобулярные белки имеют гораздо более сложную третичную структуру и часто в одной и той же полипептидной цепи содержат элементы разных типов вторичной структуры. Миоглобин — это первый глобулярный белок, третичная структура которого была определена методом рентгеноструктурного анализа.
- Сложное строение глобулярных белков можно изучать, анализируя устойчивые подструктуры — супервторичные структуры, или мотивы. Для построения тысяч известных белковых последовательностей используются лишь несколько сотен мотивов. Участки полипептидной цепи, способные образовывать стабильные и независимые структуры, называют доменами.
- Четвертичная структура белка возникает в результате взаимодействия субъединиц мультисубъединичного (мультимерного) белка или крупных белковых комплексов. Некоторые мультимерные белки построены из повторяющихся единиц, состоящих из одной субъединицы или группы субъединиц (протомеров). Протомеры обычно связаны между собой поворотной или винтовой симметрией.

4.4. Денатурация и фолдинг белка

Все белки начинают свое существование на рибосомах в виде линейной последовательности аминокислотных остатков (гл. 27). Эти полипептидные цепи в процессе синтеза или по его

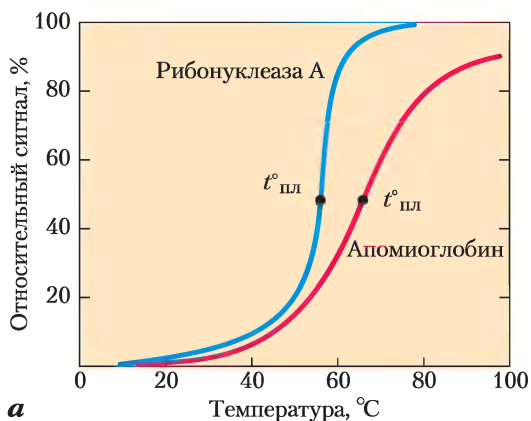
завершении должны соответствующим образом свернуться, чтобы принять свою нативную конформацию. Мы уже подчеркивали, что нативная конформация белка устойчива лишь условно. Совсем небольшие изменения окружающих параметров могут привести к таким структурным изменениям белка, которые скажутся и на его функции. Теперь рассмотрим подробнее процессы сворачивания и разворачивания белка.

Нарушение структуры приводит к потере белком своих функций

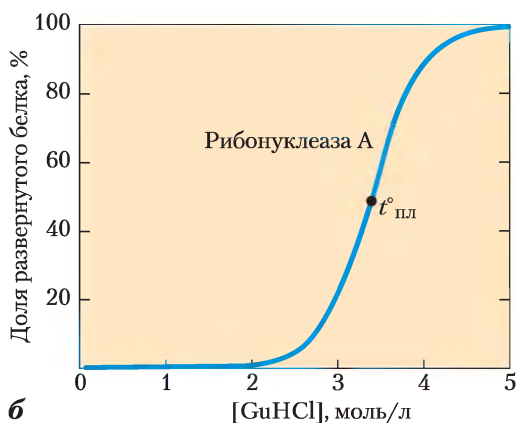
Специфическая структура белка сформировалась для обеспечения реализации его функций в определенном окружении в клетке. Условия, отличающиеся от условий в клетке, могут в различной степени повлиять на структуру белка. Нарушение трехмерной структуры белка, способное повлечь за собой потерю его функции, называют **денатурацией**. Денатурированное состояние совсем не обязательно соответствует полностью развернутой конформации белка. В большинстве случаев денатурированные белки находятся в частично развернутых состояниях, которые еще не до конца изучены.

Многие белки денатурируют под действием тепла, которое сложным образом влияет на слабые взаимодействия (в первую очередь на водородные связи) в белке. Если температура повышается медленно, конформация белка обычно остается неизменной вплоть до внезапного нарушения структуры (и функции), происходящего в узком интервале температур (**рис. 4-25**). Резкость этого перехода говорит о том, что разворачивание представляет собой кооперативный процесс: нарушение структуры в одной части белка дестабилизирует другие его части. Действие нагревания на белки не является полностью предсказуемым. Термостабильные белки бактерий-термофилов функционируют при температуре горячих источников, т. е. около 100 °С. Интересно, что структура этих белков лишь немногим отличается от структуры гомологичных им белков, например, у бактерии *Escherichia coli*. До сих пор остается загадкой, каким образом столь незначительные отличия обеспечивают стабильность при высоких температурах.

Белки также денатурируют при сильных изменениях кислотности, в присутствии некоторых смешиваемых с водой растворителей, таких как



а



б

Рис. 4-25. Денатурация белка. Показаны процессы денатурации белков под действием двух различных факторов. В каждом случае наблюдается довольно резкий переход между свернутой и развернутой конформацией, что говорит в пользу кооперативности процесса разворачивания белка. а) Тепловая денатурация апомиоглобина лошади (миоглобин без гемовой группы) и рибонуклеазы А (дисульфидные связи белка сохраняются, см. рис. 4-26). Средняя точка интервала температур, в котором происходит денатурация, называется температурой плавления ($t^{\circ}_{пл}$). За денатурацией апомиоглобина следили с помощью метода кругового дихроизма (см. рис. 4-9), позволяющего определять число спиральных структур в макромолекулах. Денатурацию рибонуклеазы А регистрировали по изменениям флуоресценции белка, связанным с изменением окружения остатков Trp. б) Денатурация рибонуклеазы А под действием гуанидин-гидрохлорида (GuHCl), определенная методом кругового дихроизма; дисульфидные связи белка сохраняются.

спирты или ацетон, а также мочевины, гидрохлорида гуанидина и детергентов. Каждый из этих факторов оказывает сравнительно слабое воздействие в том смысле, что ни одна ковалентная связь в полипептидной цепи белка не разрывается.

Действие органических растворителей, мочевины и детергентов преимущественно заключается в нарушении гидрофобных взаимодействий, обеспечивающих устойчивость сердцевины глобулярных белков. Экстремальные значения pH изменяют суммарный заряд белка, что вызывает электростатическое отталкивание различных групп и разрыв некоторых водородных связей. В результате действия перечисленных факторов белок может переходить в денатурированное состояние и необязательно в одно и то же.

Аминокислотная последовательность определяет трехмерную структуру

Третичная структура глобулярного белка определяется его аминокислотной последовательностью. Наиболее веским доказательством этого тезиса являются эксперименты по обратимой инактивации белков. Некоторые глобулярные белки теряют свою нативную конформацию под действием тепла, экстремальных значений pH или денатурирующих агентов, при возвращении к исходным условиям вновь обретают нативную структуру и биологическую активность. Этот процесс называют **ренатурацией**.

Классическим примером может служить ренатурация рибонуклеазы А, продемонстрированная Кристианом Анфинсеном в 1950-х гг. При обработке очищенного препарата рибонуклеазы А концентрированным раствором мочевины в присутствии восстановителя фермент полностью денатурирует. Восстановитель разрушает четыре дисульфидные связи в молекуле рибонуклеазы с образованием свободных остатков Cys, а мочевина нарушает стабилизирующие гидрофобные взаимодействия. В таких условиях полипептидная цепь полностью разворачивается, и фермент лишается своей каталитической активности. Если удалить мочевину и восстановитель, то беспорядочным образом скрученная молекула рибонуклеазы самопроизвольно сворачивается, принимая присущую ей нативную конформацию; каталитическая активность фермента восстанавливается (рис. 4-26). Процесс сворачивания рибонуклеазы настолько точен, что все четыре внутримолекулярных дисульфидных мостика оказываются на прежних местах. Математический расчет показывает, что существует 105 способов образования дис-

ульфидных мостиков между восемью остатками Cys. Действительно, в присутствии денатурирующих агентов дисульфидные связи образуются абсолютно случайным образом; это говорит о том, что для правильного расположения дисульфидных связей и восстановления нативной конформации необходимы слабые взаимодействия. Позднее аналогичные результаты были получены с использованием синтезированного химическим путем каталитически активного препарата рибонуклеазы А. Подобный эксперимент полностью исключил возможность, что минорные компоненты в очищенном препарате Анфинсена

принимали какое-либо участие в ренатурации белка, и окончательно доказывал самопроизвольность процесса фолдинга.

Эксперимент, проведенный Анфинсеном, впервые доказал, что аминокислотная последовательность полипептидной цепи содержит в себе всю информацию, необходимую для формирования нативной трехмерной структуры белковой молекулы. Дальнейшие исследования показали, что это верно лишь для незначительного числа белков, многие из которых имеют небольшой размер и стабильны по своей природе. Но даже если все белки имеют тенденцию принимать нативную конформацию, многим для этого нужна определенная помощь, о чем мы поговорим далее.

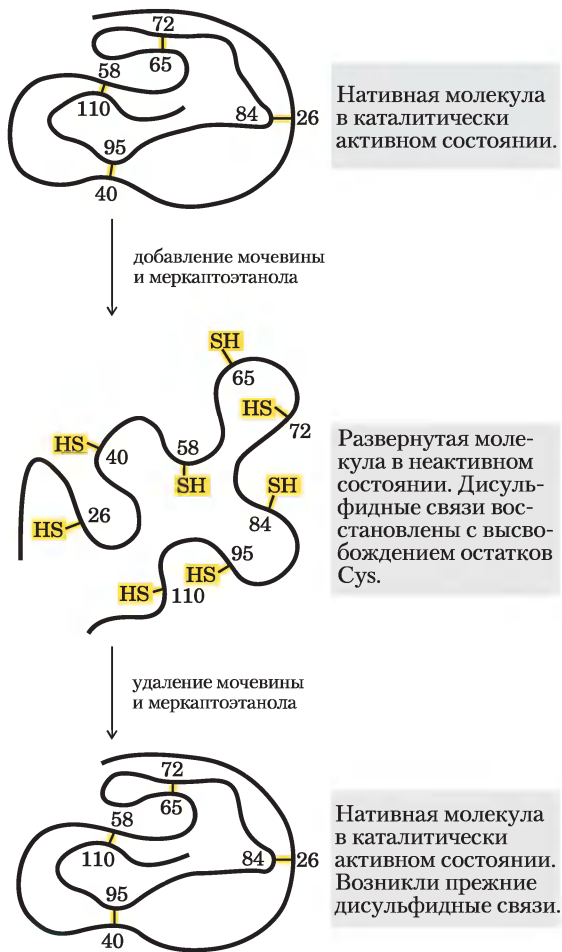


Рис. 4-26. Ренатурация развернутой молекулы рибонуклеазы. Мочевина вызывает денатурацию рибонуклеазы, а меркаптоэтанол ($\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) восстанавливает дисульфидные связи с высвобождением восьми остатков Cys. В результате ренатурации происходит восстановление исходных дисульфидных мостиков.

Свертывание полипептидной цепи происходит быстро и поэтапно

В живых клетках процесс сборки белка из отдельных аминокислот происходит с очень высокой скоростью. Например, клетка *E. coli* при 37°C способна синтезировать биологически активный белок, состоящий из 100 аминокислотных остатков, за 5 с. Каким образом образующаяся полипептидная цепь принимает нативную конформацию? Предположим, что в среднем каждый аминокислотный остаток может находиться в 10 различных конформационных состояниях; отсюда получаем, что возможное число конформационных состояний полипептидной цепи равно 10^{100} . Далее пусть самопроизвольное сворачивание белка происходит путем случайного перебора всех возможных конформаций вокруг каждой одинарной связи в полипептидной цепи до тех пор, пока не будет найдена нативная биологически активная конформация. Если каждое конформационное состояние проверяется за кратчайшее время (около 10^{-13} с — период колебания молекулы), то проверка всех возможных вариантов для такого полипептида займет 10^{77} лет! Таким образом, процесс укладки полипептидной цепи не может осуществляться методом проб и ошибок. Должны существовать какие-то более короткие пути. Впервые внимание этой проблеме уделил Сайрус Левинталь в 1968 г., и данное явление иногда называют «парадоксом Левинталя».

Процесс укладки большой полипептидной цепи, безусловно, подчиняется сложным механизмам, и мы до сих пор не знаем в точности,

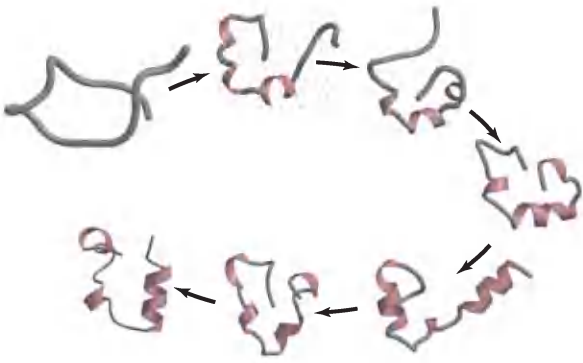


Рис. 4-27. Модель фолдинга белка. Компьютерная модель фолдинга участка из 36 аминокислотных остатков виллина (актинсвязывающего белка, обнаруженного в микроворсинках кишечника). Процесс начинается со скрученной случайным образом пептидной цепи, окруженной оболочкой из 3000 молекул воды. При моделировании наиболее вероятных промежуточных стадий свертывания учитывали движения полипептидной молекулы и влияние водной оболочки. В данном случае процесс фолдинга протекает за 0,1 мс.

как же он происходит. Однако интенсивные исследования привели к формулировке нескольких возможных механизмов этого процесса. По одной из гипотез процесс фолдинга имеет определенную иерархию. В первую очередь образуются локальные вторичные структуры. Некоторые аминокислотные последовательности легко образуют α -спирали или β -слои в соответствии с теми ограничениями, о которых мы говорили при обсуждении вторичной структуры белка. Ионные взаимодействия заряженных групп, которые часто располагаются рядом в линейной последовательности полипептидной цепи, могут играть важную роль на этих ранних стадиях укладки белка. Затем происходят взаимодействия между более удаленными частями цепи, скажем, две α -спирали могут образовывать супервторичную структуру. Этот процесс продолжается до окончательного формирования доменов и всего белка (рис. 4-27). Следует заметить, что белки, в которых доминируют близкие взаимодействия (между основаниями, расположенными недалеко друг от друга в полипептидной цепи), обычно сворачиваются быстрее, чем белки с более сложным характером укладки и большим количеством дальних взаимодействий между отдельными фрагментами.

В соответствии с другой моделью фолдинг начинается со спонтанного перехода полипептида в компактное состояние; действующей силой этого перехода являются гидрофобные взаимодействия между неполярными остатками. В результате подобного «гидрофобного коллапса» некоторые участки молекулы могут организовать соответствующие вторичные структуры, однако в основном боковые цепи аминокислотных остатков не зафиксированы окончательно. Подобное состояние полипептидной цепи называют «**расплавленной глобулой**». Механизм фолдинга большинства белков, возможно, включает элементы обеих описанных моделей. Вместо того чтобы следовать каким-то одним путем, белковые молекулы используют различные пути, ведущие к одному и тому же конечному результату. При этом по мере приближения к нативной конформации реализуется целый ряд конформационных состояний, отвечающих частично упакованным белковым структурам.

С термодинамической точки зрения процесс фолдинга можно представить в виде некоей «воронки» (рис. 4-28). Развернутые состояния характеризуются высокой конформационной энтропией и сравнительно высокой свободной энергией. По мере свертывания цепи происходит сужение «воронки», отражающее снижение числа возможных конформационных состояний. Промежуточные энергетические минимумы соответствуют частично свернутым состояниям белка, которые несколько тормозят приближение к окончательному варианту структуры. На дне «воронки» число возможных конформаций снижается до одной-единственной нативной конформации (или одной из небольшого числа возможных нативных конформаций).

Термодинамическая устойчивость отдельных участков белковой молекулы может различаться — существуют области с высокой и низкой термодинамической устойчивостью. Например, белок может состоять из двух стабильных доменов, соединенных менее устойчивым сегментом; один небольшой участок домена может быть менее стабильным, чем основная структура. Участки с относительно низкой стабильностью позволяют белку изменять свою конформацию, переходя от одного состояния к другому. Как мы увидим в следующих двух главах, различная стабильность участков молекулы белка часто необходима для реализации его функции.

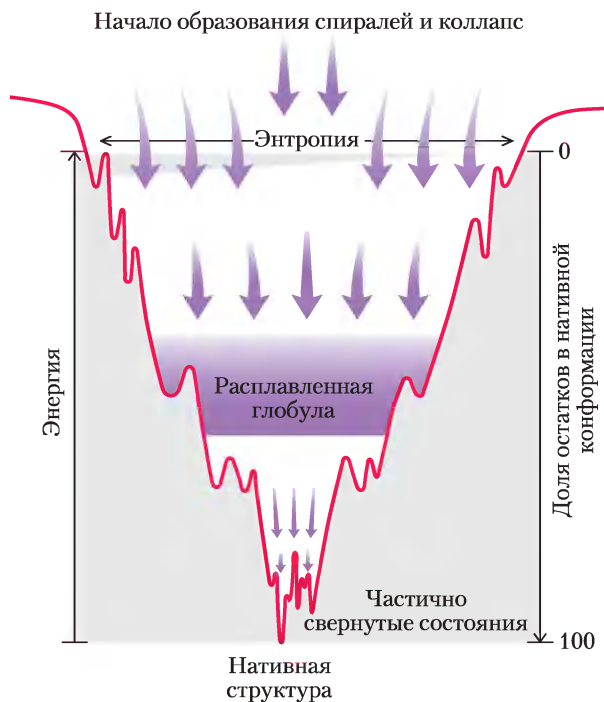


Рис. 4-28. Термодинамика процесса фолдинга белка. В верхней части «воронки» возможно большое число конформаций, следовательно, конформационная энтропия велика. На данном рисунке учтена только малая часть внутримолекулярных взаимодействий, реализующихся в нативной конформации. По мере свертывания белка и продвижения вниз по «воронке» уменьшается число возможных состояний (энтропия уменьшается), увеличивается доля белка в нативной конформации и уменьшается свободная энергия. Локальные минимумы по краям воронки соответствуют промежуточным частично свернутым состояниям, наличие которых иногда может затормозить процесс фолдинга.

По мере расширения наших знаний о процессе укладки белка и о структуре белка появляются все более сложные компьютерные программы, позволяющие предсказать структуру белка на основании его аминокислотной последовательности. Предсказанием структуры белка занимается биоинформатика, а прогресс в этой области оценивается в ходе проводимых каждые два года соревнований CASP (*Critical Assessment of Structural Prediction*). Участники со всего мира соревнуются в предсказании (вслепую) структуры заданного белка, чья структура уже определена, но пока не опубликована. Достигшие наилучших результатов команды

приглашаются представить свои результаты на конференции CASP. Пока задача предсказания структуры белка не имеет абсолютно надежных решений, однако CASP вносит большой вклад в совершенствование новых методов предсказания и повышение их точности.

Фолдинг некоторых белков протекает при участии молекулярных шаперонов

Не все белки самопроизвольно принимают нативную конформацию после синтеза в клетке. В некоторых случаях в фолдинге участвуют **молекулярные шапероны** — белки, которые взаимодействуют с частично свернутыми или неправильно свернутыми полипептидными цепями и обеспечивают нормальный фолдинг. Хорошо изучены два класса молекулярных шаперонов. Оба они обнаружены в самых разных организмах — от бактерии до человека. К первому семейству белков, названному **Hsp70**, обычно относят белки с молекулярной массой около 70 000. Число Hsp70 увеличивается при воздействии на клетку повышенной температуры, отсюда и происходит их название — белки теплового шока с $M_r = 70\ 000$ (*heat shock proteins*, Hsp70). Эти белки связываются с участками развернутого полипептида, имеющими много гидрофобных оснований, и предотвращают аномальную агрегацию. Таким образом эти шапероны защищают денатурированные тепловым воздействием белки, а также только что синтезированные и еще не свернутые пептиды. Кроме того, Hsp70 препятствуют фолдингу тех белков, которые должны оставаться в развернутом состоянии до тех пор, пока те не будут транспортированы через мембрану (см. гл. 27). Некоторые шапероны облегчают образование четвертичной структуры олигомерных белков. Вместе с белками Hsp70 в цикле связывания и высвобождения полипептидов участвуют и другие белки (например, Hsp40). На **рис. 4-29** показан механизм фолдинга белка *E. coli* при участии шаперонов DnaK и DnaJ — гомологов эукариотических шаперонов Hsp70 и Hsp40. Сначала белки DnaK и DnaJ были идентифицированы как участники процесса репликации ДНК некоторых вирусов *in vitro* (отсюда их название «Dna»).

Второй класс шаперонов — **шаперонины**. Эти белковые комплексы осуществляют фол-

динг тех белков, которые не могут сворачиваться самопроизвольно. По оценкам, от 10 до 15% белков *E. coli* для нормальной укладки требуют постоянного присутствия системы шаперонинов, называемой GroEL/GroES, а при тепловом воздействии на клетки в помощи шаперонинов нуждаются 30% белков. Исследователи впервые столкнулись с этими белками, когда выяснилось, что они необходимы для роста некоторых вирусов бактерий («Gro» происходит от англ. *growth* — рост). Развернутые белки связываются в карманах комплекса GroEL, после чего

эти карманы на некоторое время закрываются, как крышкой, белками GroES (рис. 4-30). Затем GroEL подвергается последовательным конформационным изменениям, сопряженным с гидролизом АТФ и высвобождением GroES, способствующим фолдингу связанного полипептида. Детали механизма, в соответствии с которым шаперонин GroEL/GroES облегчает свертывание белков, пока неизвестны, но ясно, что важную роль в этом процессе играют размер и свойства поверхности той полости, в которой происходит свертывание.

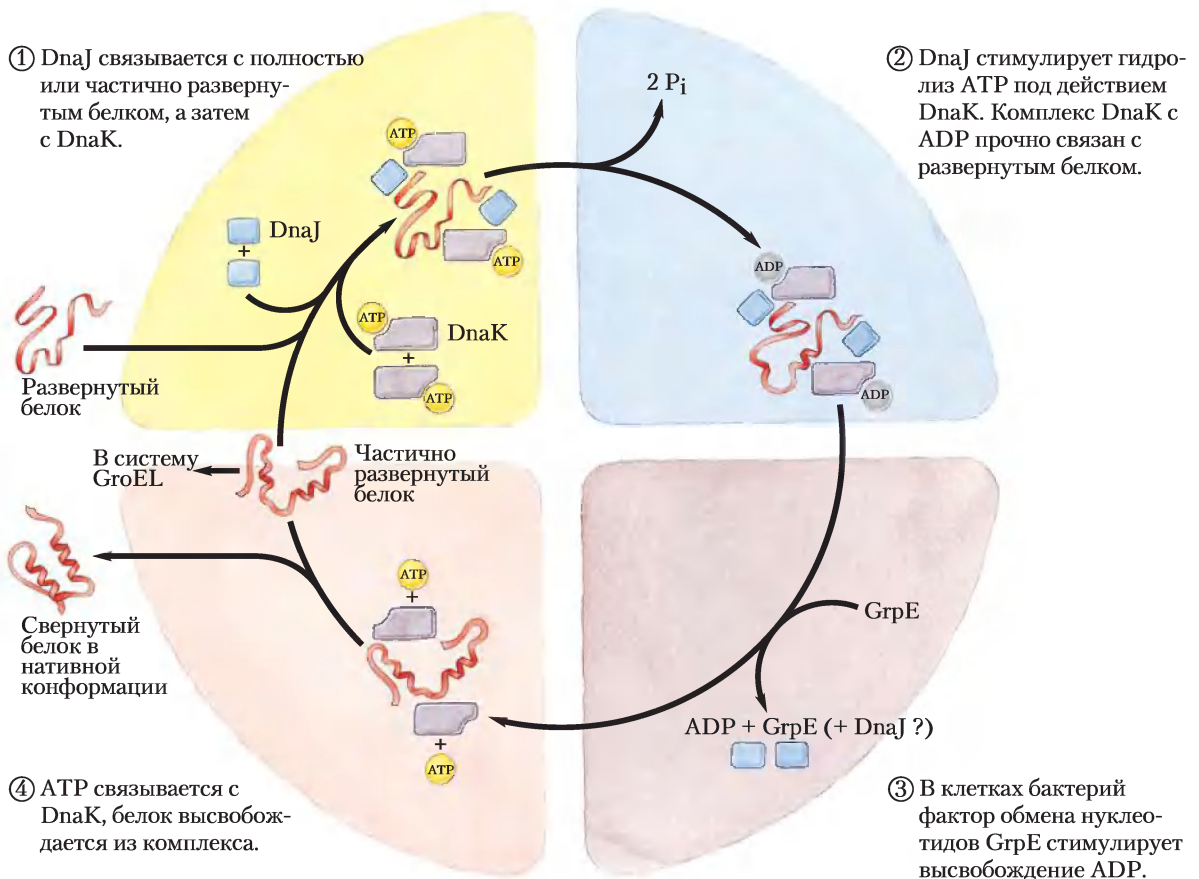
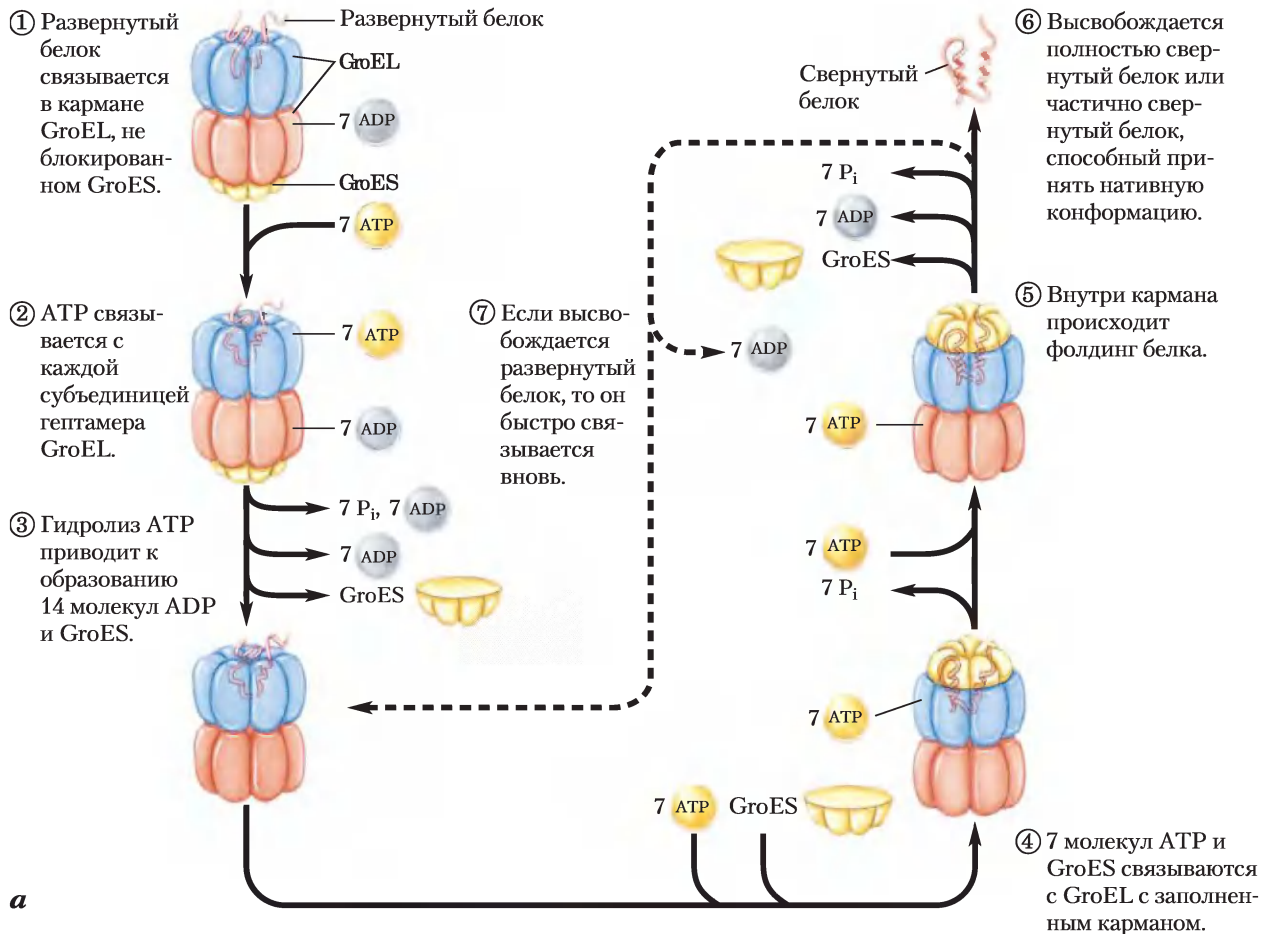


Рис. 4-29. Участие шаперонов в фолдинге белка. Циклический механизм связывания и высвобождения полипептидной цепи в клетках *E. coli* продемонстрирован на примере шаперонов DnaK и DnaJ — гомологов шаперонов эукариот Hsp70 и Hsp40. Действие шаперонов направлено не на активацию фолдинга белка, а на предотвращение агрегации развернутых белков. В конце цикла определенная фракция полипептидов оказывается в нативной конформации. Оставшаяся часть вновь связывается DnaK или разделяется с помощью шаперонинов (GroEL, см. рис. 4-30). У бактерий белок GrpE на короткое время связывается с DnaK на заключительных фазах цикла (стадия 3), способствуя диссоциации АDР и, возможно, DnaJ. Аналог GrpE в эукариотических клетках неизвестен.



a

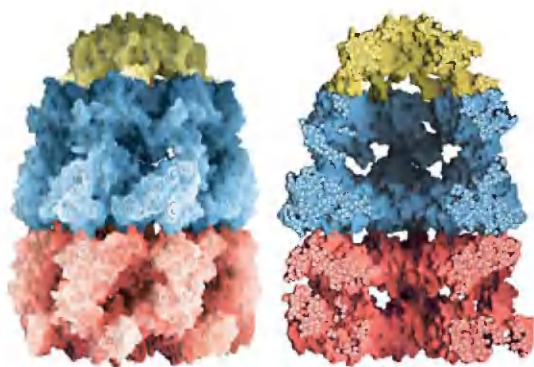


Рис. 4-30. Фолдинг белка с участием шаперонинов.

а) Предполагаемый механизм действия шаперонинов GroEL (из семейства белков Hsp60) и GroES в клетках *E. coli*. Каждый комплекс GroEL состоит из двух больших карманов, образованных двумя гептамерными кольцевыми структурами (M_r каждой субъединицы 57 000). GroES тоже гептамер (M_r субъединицы 10 000); он блокирует вход в один из карманов GroEL. б) Изображение поверхности и внутренней части комплекса GroEL/GroES (PDB ID 1AON). На правом рисунке видно большое внутреннее пространство, необходимое для связывания других белков.

Наконец, некоторым белкам для нормального свертывания требуется помощь двух ферментов, катализирующих реакции изомеризации. **Дисульфидизомераза белков (PDI)** — это распространенный фермент, катализирующий изменение положения дисульфидных связей до тех пор, пока не возникнут дисульфидные связи,

соответствующие нативной конформации. Кроме прочего, PDI катализирует удаление промежуточных продуктов фолдинга с неправильным расположением дисульфидных мостиков. **Пептидилпролил-цис-транс-изомераза (PPI)** необходима для катализа взаимных превращений *цис*- и *транс*-изомеров пролина (рис. 4-7, б), поскольку

эта стадия может замедлять фолдинг белков, содержащих остатки Pro в *cis*-конформации.

По всей вероятности, фолдинг белка во внутриклеточной среде протекает более сложно, чем в пробирке. Исследование механизмов фолдинга продолжается, и, возможно, будут открыты новые классы белков, участвующих в этом процессе.

Нарушения фолдинга белка могут быть причиной целого ряда генетических заболеваний человека



Несмотря на существование множества вспомогательных механизмов, предназначенных облегчать свертывание белка, неправильное свертывание все же встречается. Эта проблема постоянно существует в клетке: свыше четверти всех синтезируемых клеткой полипептидов уничтожаются, поскольку оказываются свернутыми неправильно. В некоторых случаях неправильное свертывание является единственной причиной или одной из причин серьезного заболевания.

Такие состояния, как диабет II типа, болезни Альцгеймера, Хантингтона, Паркинсона, возникают в результате нарушения нормального процесса свертывания. Как правило, при этих болезнях растворимый белок, который в норме секретируется клеткой, секретируется в неправильно свернутом виде и превращается в нерастворимые внеклеточные **амилоидные волокна**. Такие заболевания относят к **амилоидозам**. Образующиеся неразветвленные волокна диаметром от 7 до 10 нм имеют упорядоченную структуру и содержат много фрагментов со структурой β -слоев. Эти β -слои ориентированы перпендикулярно оси волокна. В некоторых амилоидных волокнах образуются длинные двухслойные β -структуры, как те, что изображены на **рис. 4-31** для β -амилоида.

Многие белки могут иметь структуру амилоидных волокон (а не нормальную конформацию), и у большинства этих белков в центральной части β -слоя сосредоточены ароматические аминокислотные остатки. Белки секретируются в не полностью свернутом состоянии. Центральная часть β -слоя (или ее фрагмент) формирует-ся до того, как произойдет правильная укладка остального белка, так что β -слои одного или нескольких не полностью свернутых белков могут взаимодействовать между собой, образуя

волокна. Волокна наращиваются во внеклеточном пространстве. Другие части белка сворачиваются независимо, оставаясь вне центральной части β -слоев, образующих волокна (рис. 4-31, а; роль ароматических остатков в стабилизации данной структуры отражена на рис. 4-31, в). Поскольку большая часть молекул белка сворачивается нормально, первые признаки амилоидоза появляются нескоро. Однако, если у ребенка в результате наследования мутации происходит замена какой-то аминокислоты в той части цепи, которая участвует в формировании амилоидных волокон, на ароматическую аминокислоту, симптомы заболевания могут проявиться в очень раннем возрасте. Развитию заболевания также может способствовать нарушение механизма уничтожения неправильно свернутых белков.

Во многих случаях амилоидозы являются системными заболеваниями, протекающими с вовлечением многих тканей. Первичный системный амилоидоз бывает вызван отложением волокон, состоящих из неправильно свернутых легких цепей иммуноглобулина (см. гл. 5), или фрагментов легких цепей, образующихся в результате протеолитического расщепления. Средний возраст людей, у которых регистрируется заболевание, составляет 65 лет. Среди симптомов — утомляемость, хрипота, отеки и снижение массы тела; многие пациенты умирают в течение года после постановки диагноза. Часто поражаются сердце и почки. Некоторые типы амилоидоза связаны с другими заболеваниями. У пациентов с определенными хроническими инфекционными или воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, туберкулез, кистозный фиброз и некоторые формы рака, может резко усиливаться секреция полипептида, называемого сывороточным амилоидом А. Этот белок (или его фрагменты) откладывается в соединительной ткани селезенки, почек и печени, а также в области сердца. У пациентов с данным заболеванием, известным как вторичный системный амилоидоз, наблюдается целый ряд симптомов — в зависимости от того, какие органы были повреждены в первую очередь. Обычно болезнь заканчивается летальным исходом через несколько лет. Более 80 типов амилоидоза связаны с мутациями транстиретина (этот белок связывает и переносит тиреоидные гормоны, доставляя их в различные органы и в головной мозг). Множество мутаций этого белка приводят к отложению

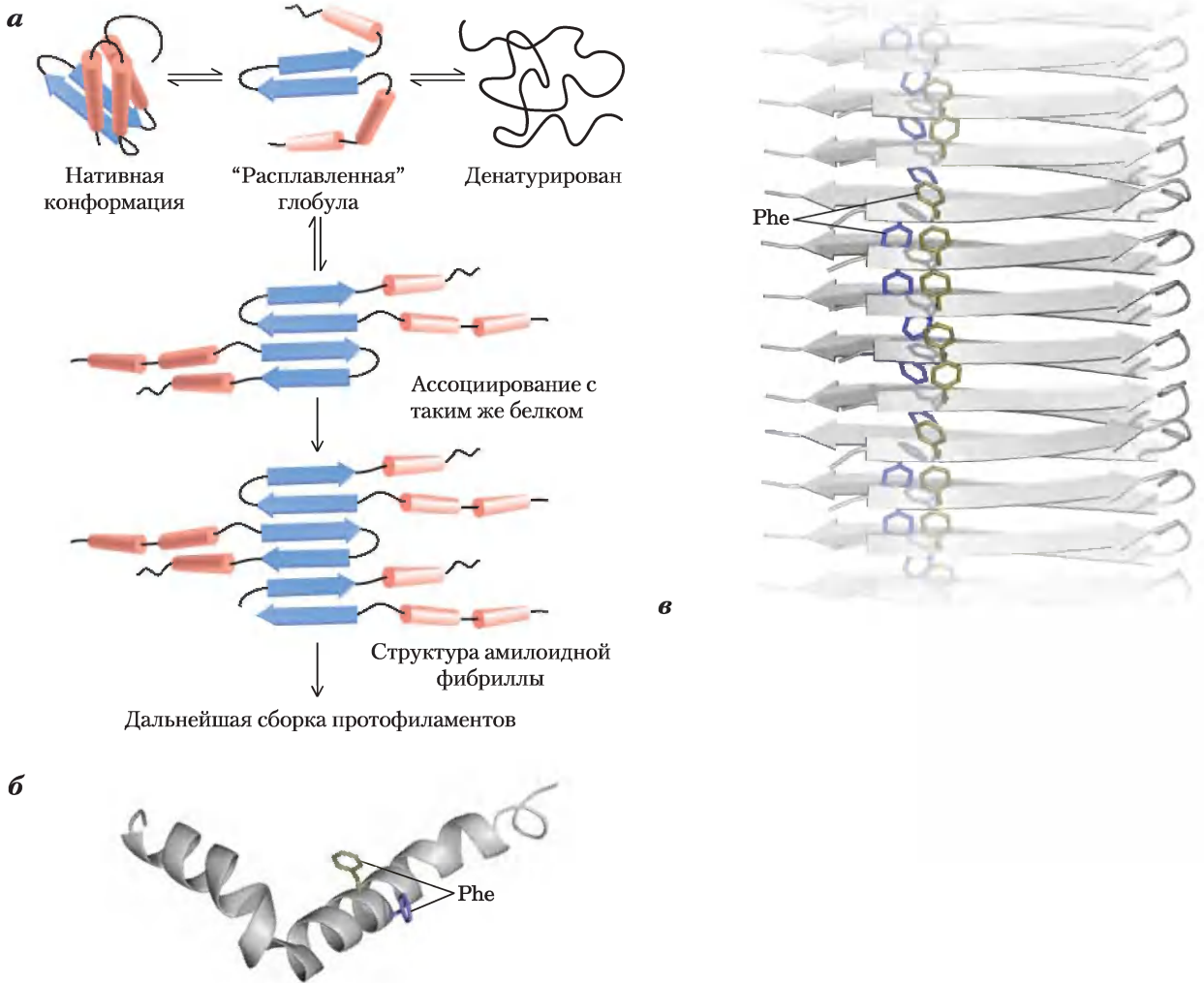


Рис. 4-31. Образование амилоидного фиброза. *а*) Молекулы белка, нормальная структура которых содержит участки частично упакованных β -слоев. У немногих молекул до того, как закончится фолдинг, участки β -слоев одного полипептида ассоциируются с аналогичным участком другого полипептида, формируя ядро амилоида. Следующие молекулы белка постепенно ассоциируются с амилоидом и удлиняют его, образуя фибриллу. *б*) β -Амилоидный белок, который играет главную роль в возникновении болезни Альцгеймера, происходит из большого трансмембранного белка, который называют белком-предшественником β -амилоида или APP (от англ. *amyloid- β precursor protein*). Этот белок обнаружен в большинстве тканей человека. Когда он является частью большого белка, пептид состоит из двух α -спиральных участков, пронизывающих мембрану. Когда внешний и внутренний домены (каждый из которых несет самостоятельные функции) расщепляются специальными протеазами, оставшийся относительно неустойчивый β -амилоидный белок покидает мембрану и теряет свою α -спиральную структуру. После этого он может постепенно сформировать амилоидную фибриллу (*в*), которая способствует появлению характерных бляшек на поверхности нейронов у людей, страдающих болезнью Альцгеймера. В амилоиде много β -слоев, ориентированных перпендикулярно оси амилоидной фибриллы. В β -амилоидном белке возникают вытянутые двухслойные параллельные β -складки. Остальные участки могут принимать форму левозакрученных β -спиралей (см. рис. 4-21).

амилоидных волокон в различных тканях, что сопровождается появлением многочисленных симптомов. Кроме того, амилоидозы бывают вызваны наследуемыми мутациями лизоцима, α -цепи фибриногена А, а также аполипопротеинов А-I и А-II; все эти белки описаны в следующих главах книги. При некоторых типах заболевания поражаются лишь определенные органы. Амилоидный белок обычно секретируется только пораженной тканью, так что его высокая концентрация вокруг этой ткани приводит к отложению амилоидных волокон именно в этой области (хотя часть белка может распространяться по всему организму). Часто отложение амилоидных волокон происходит вокруг β -клеток панкреатического островка, ответственных за секрецию инсулина и метаболизм глюкозы (рис. 23-27). Секреция β -клетками небольшого пептида (37 аминокислотных остатков), называемого островковым амилоидным полипептидом, или амилином, может приводить к отложению амилоида вокруг панкреатических островков и постепенному разрушению клеток. У здорового взрослого человека от 1 до 1,5 млн панкреатических β -клеток. При прогрессирующем исчезновении этих клеток нарушается гомеостаз глюкозы, а при потере 50% клеток появляются признаки сахарного диабета II типа.

Особый тип амилоидозов связан с отложением амилоида, приводящим к разрушению нервных клеток, в основном у пожилых людей. Болезнь Альцгеймера вызвана отложением внеклеточного амилоида нейронами при участии белка, называемого β -амилоидным пептидом. Отложение амилоида, по-видимому, является основной причиной заболевания, но кроме того, в нейронах у таких больных происходит агрегация белка тау. Наследственная мутация белка тау не

приводит к болезни Альцгеймера, но вызывает не менее тяжелые заболевания — лобно-височную деменцию и паркинсонизм (состояние, напоминающее по симптомам болезнь Паркинсона).

При некоторых других нейродегенеративных заболеваниях происходит внутриклеточная агрегация аномально свернутых белков. При болезни Паркинсона аномально свернутая форма белка α -синуклеина образует волокнистые массы, называемые тельцами Леви. В развитии болезни Хантингтона принимает участие белок хантингтин, имеющий длинный полиглутаминовый участок. У некоторых людей этот участок длиннее, чем в норме, в результате чего происходит агрегация белка в клетке. Связь подобных заболеваний с амилоидозом не совсем очевидна, однако известно, что белки, образующие нерастворимые агрегаты, имеют высокое содержание β -структур, т. е. между этими типами заболеваний, безусловно, есть некоторая общность.

Развитие тяжелого заболевания в результате неправильного свертывания белка совсем не обязательно протекает с образованием амилоида. Например, кистозный фиброз возникает в результате дефекта мембранного белка CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), выполняющего функцию ионного канала для транспорта ионов хлора. Чаще всего возникновение заболевания связано с делецией остатка Phe в положении 508 белка CFTR, которая приводит к появлению неправильно упакованного белка. Большая часть белка уничтожается, и его нормальная функция не выполняется (см. доп. 11-3). Многие мутации коллагена (с. 191), вызывающие нарушение свертывания, также приводят к развитию заболеваний. Ярчайший пример нарушения свертывания белка — прионовая болезнь (доп. 4-6). ■

Дополнение 4–6



МЕДИЦИНА

Смерть из-за неправильного сворачивания белка: прионы

Аномальное сворачивание белков является причиной нескольких редких дегенеративных заболеваний мозга у млекопитающих. Возможно, наиболее известным из них является бычья губчатая энцефалопатия, БГЭ («коровье бешенство»). Среди сходных заболеваний можно назвать болезни куру и Крейцфельда–Якоба у людей, скрепи (почесуха) у овец, а также хроническую изнуряющую болезнь у оленей и лосей, которые так-

же относят к губчатой энцефалопатии, поскольку мозг больного часто напоминает губку (рис. 1). Прогрессирующее разрушение мозга приводит к спектру неврологических симптомов, включая потерю массы тела, нарушение осанки, равновесия и координации, а также потерю когнитивной функции. Типичными признаками этого смертельного заболевания являются умственные отклонения и нарушения координации.

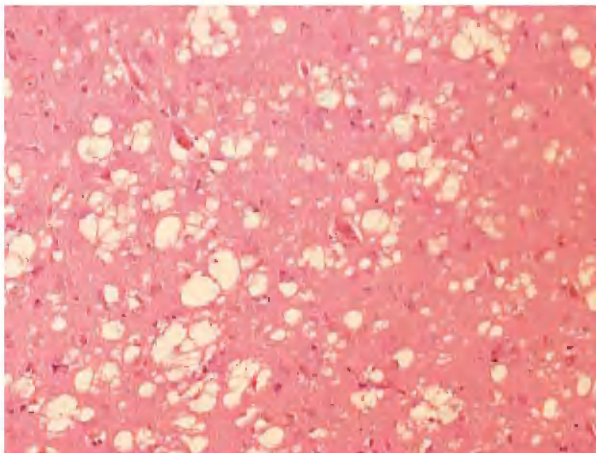


Рис. 1. Окрашенный срез коры мозга пациента с болезнью Крейтцфельда—Якоба. Видна губчатая (вакуолярная) дегенерация ткани — наиболее характерный нейростологический признак. Внутри клеток видны желтоватые вакуоли, в основном в отростках пре- и постсинаптических нейронов. В данном образце размеры вакуолей варьируют от 20 до 100 мкм.

В 1960-х гг. ученые обнаружили, что болезнетворный агент не содержит нуклеиновых кислот. Тиква Алпер выдвинула гипотезу, согласно которой этим агентом является белок. Вначале эта идея показалась бессмысленной. Все известные к тому времени болезнетворные агенты (вирусы, бактерии, грибы и др.) содержали нуклеиновые кислоты, а их вирулентность была связана с воспроизведением и распространением генетического материала. Но более 40 лет исследований, в частности работы Стенли Прузинера, показали, что губчатая энцефалопатия имеет другой механизм.

Болезнь вызывает один-единственный белок с молекулярной массой 28 000, который Прузинер окрестил прионовым белком (от англ. *prion* — *proteinaceous infections only*). Прионовый белок (сокращенно PrP) или просто **прион** является нормальной составляющей мозговой ткани млекопитающих. Его роль в мозге детально не изучена, по-видимому, он выполняет сигнальную функцию. Штаммы мышей, не имеющих гена PrP (следовательно, и самого белка), не проявляли никаких признаков заболевания.

Болезнь возникает в тех случаях, когда нормальный клеточный PrP (PrP^C) принимает иную конформацию, названную PrP^{Sc} (Sc означает скрепи). При взаимодействии PrP^{Sc} с PrP^C последний также переходит в аномальную конформацию, инициируя цепную реакцию, в результате которой все большая часть этого белка в мозге переходит в болезнетворную форму. Пока не удалось установить, каким образом наличие PrP^{Sc} приводит к развитию губчатой энцефалопатии.

При наследственной форме заболевания мутация гена PrP приводит к замене одного аминокислотного остатка, что, по всей видимости, способствует переходу нормального белка в форму PrP^{Sc}. Для полного понимания механизма заболевания необходима дополнительная информация о воздействии приона на работу мозга. Опубликованные данные о структуре PrP начали проливать свет на те молекулярные процессы, которые лежат в основе взаимодействия прионовых белков и изменения их конформации (рис. 2).

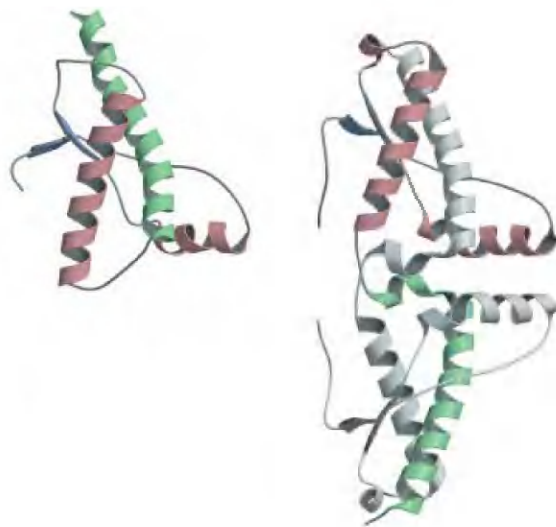


Рис. 2. Структура глобулярного домена PrP человека в мономерной (слева) и димерной формах (справа). Вторая субъединица выделена серым цветом для того, чтобы подчеркнуть те катастрофические изменения конформации α -спирали, изображенной зеленым цветом, которые происходят при образовании димера.

Краткое содержание раздела 4.4

Денатурация и фолдинг белка

- Трехмерная структура и функции белков могут нарушаться в процессе денатурации, что еще раз демонстрирует связь между структурой и функциями белка. Некоторые денатурированные белки способны самопроизвольно вернуться в биологически активное состояние; это означает, что третичная структура белка определяется его аминокислотной последовательностью.
- Фолдинг белка в клетке, возможно, протекает по нескольким путям. В первую очередь образуются участки со вторичной структурой, а затем происходит формирование супервторичных структур. Множество вариантов частично свернутых белков быстро принимают единственную нативную конформацию.
- Фолдингу многих белков способствуют специализированные белки — шапероны Hsp70 и шаперонины. Специальные ферменты катализируют образование дисульфидной связи и *цис-транс*-изомеризацию пептидной связи в остатках пролина.
- Аномальное свертывание белка является молекулярной основой целого ряда заболеваний человека, включая амилоидоз.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

α -кератин 185	Нативная конформация 172
α -спираль 177	Молекулярный шаперон 212
β -структура 181	Мотив 200
β -поворот 182	Мультимер 205
β -слой 181	Олигомер 205
Hsp70 212	Пептидная группа 174
Вторичная структура 177	Прион 218
Глобулярный белок 185	Протомер 205
Денатурация 208	Расплавленная глобула 211
Домен 200	Семейство белков 203
Карта Рамачандрана 176	
Коллаген 187	
Конформация 172	

Симметрия 207	Фибриллярный белок 185
Сольватная оболочка 173	Фиброин шелка 192
Супервторичная структура 200	Четвертичная структура 185
Третичная структура 184	Шаперонин 212

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая информация

Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223–230.

Авторский обзор классических работ по рибонуклеазе.

Branden, C. & Tooze, J. (1991) *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York.

Creighton, T.E. (1993) *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed., W.H. Freeman and Company, New York.

Полезный и авторитетный источник.

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **52**.

Сборник прекрасных статей по многим вопросам, в том числе касающимся структуры, фолдинга и функций белков.

Kendrew, J.C. (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* 205 (December), 96–111.

История определения структуры миоглобина.

Richardson, J.S. (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Prot. Chem.* **34**, 167–339.

Прекрасный обзор структуры и принципов организации белков; автор ввел в употребление очень полезные ленточные модели белковых структур.

Вторичная, третичная и четвертичная структуры

Berman, H.M. (1999) The past and future of structure databases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 76–80.

Широкий обзор различных подходов, используемых для каталогизации белковых структур.

Brenner, S.E., Chothia, C., & Hubbard, T.J.P. (1997) Population statistics of protein structures: lessons from structural classifications. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 369–376.

Fuchs, E. & Cleveland, D.W. (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* **279**, 514–519.

McPherson, A. (1989) Macromolecular crystals. *Sci. Am.* **260** (March), 62–69.

Описание технологии кристаллизации макромолекул, в частности белков.

Ponting, C.P. & Russel, R.R. (2002) The natural history of protein domains. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**, 45–71.

О том, как использовать информацию о структуре белков из банков данных для изучения процесса эволюции.

Prockop, D.J. & Kivirikko, K.I. (1995) Collagens, molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 403–434.

Денатурация и фолдинг белка

Baldwin, R.L. (1994) Matching speed and stability. *Nature* **369**, 183–184.

Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C., & Craig, E.A. (2000) Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119–122.

Хороший обзор механизмов действия шаперонов.

Collinge, J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 519–550.

Creighton, T.E., Darby, N.J., & Kemmink, J. (1996) The roles of partly folded intermediates in protein folding. *FASEB J.* **10**, 110–118.

Daggett, V. & Fersht, A.R. (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci.* **28**, 18–25.

Dill, K.A. & Chan, H.S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 10–19.

Luque, I., Leavitt, S.A., & Freire, E. (2002) The linkage between protein folding and functional cooperativity: two sides of the same coin? *Annu. Rev. Biophys. Struct.* **31**, 235–256.

О влиянии устойчивости структуры белка на его функции.

Nicotera, P. (2001) A route for prion neuroinvasion. *Neuron* **31**, 345–348.

Prusiner, S.B. (1995) The prion diseases. *Sci. Am.* **272** (January), 48–57.

Обзор доказательств прионовой гипотезы.

Richardson, A., Landry, S.J., & Georgopolous, C. (1998) The ins and outs of a molecular chaperone machine. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 138–143.

Thomas, P.J., Qu, B.-H., & Pederson, P.L. (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 456–459.

Westaway, D. & Carlson, G.A. (2002) Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 301–307.

Хороший современный обзор.

Вопросы и задачи

1. Свойства пептидной связи. При рентгеноструктурном анализе кристаллических пептидов Лайнус Полинг и Роберт Кори обнаружили, что связь С–N пептидной группы по длине (1,32 Å) занимает промежуточное положение между типичной одинарной С–N (1,49 Å) и двойной С=N (1,27 Å) связями. Кроме того, они установили, что пептидная группа имеет

плоскую конфигурацию, т. е. все четыре атома, присоединенные к С–N-группе, лежат в одной плоскости, причем два атома углерода, связанные с С–N-группой, всегда находятся в *транс*-положении друг к другу, по разные стороны от пептидной связи.

а) Какой вывод относительно прочности и кратности пептидной связи (является ли она одинарной, двойной или тройной) можно сделать, исходя из ее длины?

б) Что можно сказать о возможности вращения вокруг пептидной С–N-связи на основании данных Полинга и Кори?

2. Связь структуры и функции фибриллярных белков.

Уильям Астбери первым обнаружил, что рентгенограмма шерсти указывает на наличие структурной единицы волокна, повторяющейся с интервалом около 5,2 Å. Рентгенограмма шерсти, растянутой после обработки паром, указывала на наличие периодической структуры, повторяющейся через каждые 7,0 Å. После того как растянутая при обработке паром шерсть возвращалась в свое исходное состояние, структурная единица вновь повторялась с периодичностью 5,2 Å. Хотя эти наблюдения послужили ключом к пониманию молекулярной структуры шерсти, в то время Астбери не смог их интерпретировать.

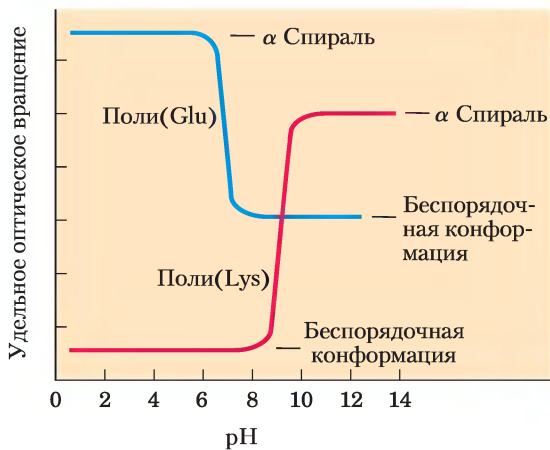
а) Исходя из современных данных о структуре шерсти объясните результаты экспериментов Астбери.

б) Если шерстяные вещи стирать в горячей воде или сушить горячим воздухом, они садятся, а с шелком в подобных условиях ничего не происходит. Объясните это явление.

3. Скорость синтеза α-кератина волос.

Волосы растут со скоростью 15–20 см в год. Зона роста находится у основания волоса, где в клетках эпидермиса синтезируются и скручиваются нити α-кератина (рис. 4-10). Основным структурным элементом α-кератина является α-спираль, виток которой имеет шаг 5,4 Å и содержит 3,6 аминокислотных остатка (рис. 4-4, б). Считая, что лимитирующим фактором роста волос является биосинтез спиралей кератина, рассчитайте скорость образования пептидных связей α-кератина (число пептидных связей в секунду), которая обеспечивает наблюдаемый рост волос.

4. Влияние pH на конформацию вторичной α -спиральной структуры. Разворачивание полипептидной цепи, имеющей α -спиральную структуру, и ее превращение в беспорядочно скрученный клубок сопровождаются сильным снижением удельного оптического вращения, которое является мерой способности раствора вращать плоскополяризованный свет. Полиглутаминовая кислота (полипептид, состоящий исключительно из остатков L-Glu) при pH 3,0 имеет структуру α -спирали. При повышении pH раствора полиглутаминовой кислоты до 7,0 наблюдается значительное падение удельного оптического вращения. Аналогичным образом, полилизин, состоящий из остатков L-Lys, имеет α -спиральную структуру при pH 10,0, но при снижении pH до 7,0 удельное оптическое вращение его раствора также снижается, как показано на графике.



Как объяснить подобное влияние pH на конформацию полиглутаминовой кислоты и полилизина? Почему наблюдаемый переход совершается в таком узком диапазоне pH?

5. Дисульфидные связи определяют свойства многих белков. В молекулах ряда природных белков содержится много дисульфидных связей, причем механические свойства белков (прочность на разрыв, вязкость, твердость и др.) коррелируют с числом дисульфидных связей. Например, богатый дисульфидными мостиками белок пшеницы глютенин определяет вязкость и эластичность теста, приготовленного из пшеничной муки. Точно так же твердый и прочный панцирь черепахи обязан своими

свойствами сети дисульфидных связей в молекулах α -кератина.

а) Какова молекулярная основа наблюдаемой связи между числом дисульфидных мостиков и механическими свойствами белков?

б) Большинство глобулярных белков денатурируют и теряют активность при кратковременном нагревании до 65°C . Но для денатурации глобулярных белков, содержащих несколько дисульфидных связей, обычно требуется более длительное нагревание при более высокой температуре. Примером может служить бычий панкреатический ингибитор трипсина, имеющий одну полипептидную цепь из 58 аминокислотных остатков и содержащий три дисульфидных мостика. Если этот белок денатурировать нагреванием, а затем охладить, то его активность восстанавливается. Какова молекулярная основа данного явления?

6. Аминокислотная последовательность и структура белка. Увеличивающийся объем наших знаний о процессе фолдинга белка позволяет предсказать структуру белка на основании его аминокислотной последовательности.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pe	-Ala	-His	-Thr	-Tyr	-Gly	-Pro	-Phe	-Glu	-Ala
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ala	-Met	-Cys	-Lys	-Trp	-Glu	-Ala	-Gln	-Pro	-Asp
21	22	23	24	25	26	27	28		
Gly	-Met	-Glu	-Cys	-Ala	-Phe	-His	-Arg		

а) Где в данной аминокислотной последовательности возможно образование изгибов или β -поворотов?

б) Где могут образовываться внутримолекулярные дисульфидные мостики?

в) Если предположить, что данная последовательность является частью более крупного глобулярного белка, то в какой его части (на внешней поверхности или внутри глобулы) будут располагаться следующие аминокислотные остатки: Asp, Pe, Thr, Ala, Gln, Lys? Объясните свои рассуждения. (Подсказка. См. гидропатические индексы в табл. 3-1.)

7. Бактериородопсин — белок пурпурной мембраны. При благоприятных внешних условиях бактерия *Halobacterium halobium*, обитающая

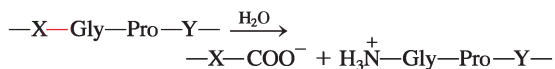
в соленых водоемах, синтезирует мембранный белок бактериородопсин ($M_r = 26\ 000$), имеющий пурпурную окраску благодаря содержащемуся в нем ретиналю (рис. 10-21). Молекулы этого белка образуют в клеточной мембране агрегаты в виде «пурпурных заплаток». Бактериородопсин действует как активируемый светом протонный насос и снабжает клетки энергией. Рентгеноструктурный анализ этого белка показал, что он состоит из семи параллельно расположенных α -спиральных участков, каждый из которых пересекает мембрану бактериальной клетки (толщина мембраны $45\ \text{\AA}$). Определите минимальное число аминокислотных остатков, необходимое для образования α -спирального участка, способного полностью пронизывать мембрану. Оцените долю аминокислотных остатков бактериородопсина, задействованных в образовании α -спиралей (считайте, что средняя молекулярная масса аминокислотного остатка равна 110).

8. Терминология в области структуры белка.

Миоглобин — это мотив, домен или завершенная трехмерная структура?

9. Патогенное действие бактерий, вызывающих газовую гангрену.

Патогенная анаэробная бактерия *Clostridium perfringens* является возбудителем газовой гангрены, при которой происходит разрушение тканей. Данная бактерия секретирует фермент, эффективно катализирующий гидролиз пептидной связи, обозначенной на схеме красным цветом:

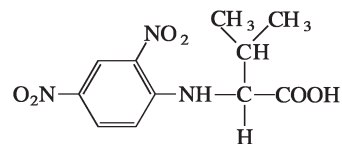


где X и Y — остатки любых из 20 обычных аминокислот. Каким образом этот фермент помогает бактерии проникнуть в ткани человека? Почему фермент не повреждает саму бактерию?

10. Число полипептидных цепей в олигомерном белке.

Образец ($m = 660\ \text{г}$) олигомерного белка с $M_r = 132\ 000$ обрабатывали избытком 2,4-динитро-фторбензола в слабощелочной среде до завершения химической реакции. Затем пептидные связи белка подвергли полному гидролизу под

действием соляной кислоты при нагревании. В гидролизате обнаружено 5,5 мг вещества следующего строения:



Никаких других 2,4-динитрофенильных производных аминокислот не было обнаружено.

а) Объясните, как на основании данной информации можно определить число полипептидных цепей в олигомерном белке.

б) Определите число полипептидных цепей белка.

в) Какие другие методы анализа помогли бы вам определить, являются ли полипептидные цепи данного белка идентичными или различаются?

11. Предсказание вторичной структуры.

Какой из указанных ниже пептидов с наибольшей вероятностью образует α -спиральную структуру и почему?

(а) LKAENDEAARAMSEA

(б) CRAGGFWDQPGTSN



12. Амилоидные волокна и болезни человека.

Выяснилось, что некоторые небольшие ароматические молекулы, такие как феноловый красный (использующийся в качестве модельного нетоксичного лекарства), в лабораторных модельных системах ингибируют образование амилоида. Свойства таких небольших ароматических соединений изучают с целью создания лекарственных средств, которые могли бы эффективно ингибировать образование амилоида в головном мозге пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера.

а) Почему молекулы с ароматическими группами могли бы препятствовать образованию амилоида?

б) Некоторые исследователи полагают, что лекарство, применяемое для лечения болезни Альцгеймера, могло бы оказаться полезным и для лечения сахарного диабета II типа (диабета взрослых). Почему одно и то же лекарство могло бы оказаться эффективным для лечения двух столь разных заболеваний?

Биохимия в Интернете

13. Моделирование белков. У группы пациентов, страдающих болезнью Крона (воспалительное заболевание кишечника), для выяснения причины заболевания была проведена биопсия слизистой кишечника. Был идентифицирован белок, уровень экспрессии которого у пациентов с болезнью Крона выше, чем в контрольной группе здоровых людей. Белок был выделен, а также была частично определена его аминокислотная последовательность (следует читать слева направо):

EAELCPDRCI	HSFQNLGIQC	VKKRDLEQAI
SQRIQTNNNP	FQVPIEEQRG	DYDLNAVRLC
FQVTVRDPSG	RPLRLPPVLP	HPIFDNRAPN
TAELKICRVN	RNSGSCLGGD	EIFLLCDKVQ
KEDIEVYFTG	PGWEARGSFS	QADVHRQVAI
VFRTPPYADP	SLQAPVRVSM	QLRRPSDREL
SEPMEFQYLP	DTDDRHRIEE	KRKRTYETFK
SIMKKSPFSG	PTDPRPPRR	IAVPSRSSAS
VPKPAPQYPY		

а) С помощью имеющихся в Интернете баз данных вы сможете определить, что это за белок. Для начала используйте такие ресурсы, как Protein Information Resource (PIR, pir.georgetown.edu/pirwww), Structural Classification of Proteins (SCOP, <http://scop.berkeley.edu>) и Prosite (<http://us.expasy.org/prosite>).

На выбранном вами сайте найдите страницу, где проводится сравнение аминокислотных последовательностей. Введите около 30 аминокислот из приведенной здесь последовательности и проведите анализ. Что проведенный анализ говорит вам о данном белке?

б) Проведите анализ, вводя различные участки последовательности. Получаете ли вы один и тот же результат?

в) Существует множество Интернет-сайтов, содержащих информацию о трехмерной структуре белков. Найдите информацию о вторичной, третичной и четвертичной структурах данного белка, пользуясь такими банками данных, как PDB (www.rcsb.org/pdb) или SCOP.

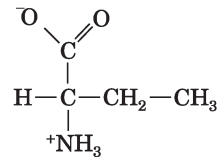
г) В процессе поиска информации о структуре белка попытайтесь также узнать и о его функции в клетке.

Анализ экспериментальных данных

14. «Зеркальные» белки. Как отмечалось в гл. 3, аминокислотные остатки в молекуле белка представляют собой исключительно L-стереоизомеры. Пока неясно, является эта особенность необходимым условием для нормального функционирования белка или случайным эволюционным событием. Для разяснения этого вопроса Милтон с коллегами (1992) предприняли работу, посвященную изучению фермента, целиком построенного из D-стереоизомеров аминокислот. Ими был выбран фермент ВИЧ-протеаза — протеолитический фермент ВИЧ, который превращает неактивную форму вирусных белков в активную.

Ранее Влодауер с коллегами (1989) осуществил полный химический синтез ВИЧ-протеазы из L-аминокислот в соответствии со схемой, изображенной на рис. 3-29. Нормальная ВИЧ-протеаза имеет два остатка цистеина — в позициях 67 и 95. Химический синтез белков, содержащих цистеин, довольно сложно осуществить технически, поэтому два остатка Cys были заменены остатками синтетической L- α -амино-*n*-масляной кислоты (Aba). Авторы объясняли, что их целью было «уменьшить сложность синтеза, связанную со снятием защиты с остатков Cys, и облегчить работу с полученным продуктом».

а) Ниже представлена структура Aba. Почему эта кислота подходит для замены цистеина? При каких условиях она не была бы подходящей заменой?



L- α -Амино-*n*-масляная кислота

Влодауер с сотрудниками подвергли синтезированный белок денатурации, растворив его в 6 М гуанидин-HCl, а затем вновь позволили ему сворачиваться в условиях диализа против нейтрального буфера (10% глицерин, 25 мМ NaH₂PO₄, pH 7).

б) Можно привести множество причин, по которым синтезированный, денатурированный и свернутый таким образом белок не будет обладать активностью. Приведите три такие причины.

в) Интересно, что образовавшаяся L-протеаза была активна. Что этот факт может сказать о роли дисульфидных связей в нативной молекуле ВИЧ-протеазы?

В новой работе Милтон с сотрудниками синтезировали ВИЧ-протеазу из D-аминокислот, используя тот же протокол, что и в ранней работе (Wlodawer et al.). Формально существует три варианта укладки D-протеазы: 1) та же форма укладки, что и в случае L-протеазы; 2) зеркальное отражение L-протеазы; 3) какая-то другая форма укладки, возможно, приводящая к неактивному белку.

г) Рассмотрите каждую возможность и объясните, насколько с вашей точки зрения она вероятна.

На самом деле, D-протеаза оказалась активной: она расщепляла синтетический субстрат и ингибировалась специфическим ингибитором. Для изучения структуры L- и D-ферментов Милтон с сотрудниками проанализировали их активность по отношению к D- и L-формам хиральных пептидных субстратов, а также ингибирование D- и L-формами хиральных ингибиторов, являвшихся аналогами субстратов. Кроме того, обе формы фермента подвергли ингибированию ахиральным ингибитором — синим красителем Эванса. Результаты эксперимента представлены в таблице.

ВИЧ- протеаза	Гидролиз субстрата		Ингибирование		
	D- субстрат	L- субстрат	Пептидный ингибитор		Синий краситель Эванса
			D-ин- гибитор	L-ин- гибитор	
L-протеаза	–	+	–	+	+
D-протеаза	+	–	+	–	+

д) Какая из предложенных выше моделей подтверждается этими результатами? Объясните свой ответ.

е) Почему синий краситель Эванса ингибировал обе формы фермента?

ж) Как вы думаете, будет ли химотрипсин расщеплять D-протеазу? Почему?

з) Можно ли полностью осуществить синтез любого белка и его ренатурацию, исходя из D-аминокислот? Почему?

Литература

Milton, R. C., Milton, S. C., & Kent, S. B. (1992) Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show demonstration of reciprocal chiral substrate specificity. *Science* **256**, 1445–1448.

Wlodawer, A., Miller, M., Jaskólski, M., Sathyanarayana, B. K., Baldwin, E., Weber, I. T., Selk, L. M., Clawson, L., Schneider, J., & Kent, S. B. (1989) Conserved folding in retroviral proteases: crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* **245**, 616–621.

Поскольку белки тем или иным образом участвуют во всех химических процессах в живом организме, определение их структуры и превращений, безусловно, окажет важнейшее влияние на развитие биологической химии.

Эмиль Фишер. Из статьи в журнале Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft zu Berlin, 1906

5

Функции белков

- 5.1. Обратимое связывание белков с лигандами: белки, связывающие кислород 226
- 5.2. Комплементарное взаимодействие между белками и лигандами: иммунная система и иммуноглобулины 249
- 5.3. Энергозависимые взаимодействия белков: актин, миозин и молекулярные моторы 256

Знание трехмерной структуры белков очень важно для понимания их функций. Однако структура, изображенная на плоском листе бумаги, обманчиво статична. Белки — это динамичные молекулы, чьи функции почти всегда связаны с взаимодействиями с другими молекулами, а эти взаимодействия регулируются удивительными, иногда очень тонкими изменениями конформации белка. В этой главе мы обсудим, каким образом белки взаимодействуют с другими молекулами и как эти взаимодействия связаны с динамической структурой белка. Вряд ли можно переоценить значение молекулярных взаимодействий для функционирования белков. В гл. 4 мы показали, что функция фибриллярных белков в качестве структурных элементов клеток и тканей зависит от устойчивых, длительных взаимодействий между идентичными полипептидными цепями.

В данной главе мы увидим, что функции многих других белков реализуются через взаимодействия со множеством различных молекул. Большинство этих взаимодействий мимолетны, тем не менее они могут быть основой сложных физиологических процессов, таких как перенос кислорода, иммунные реакции и сокращение мышц (эти три темы мы рассмотрим более подробно). На данных примерах можно проиллюстрировать ключевые принципы функционирования белков, причем с некоторыми из них вы уже познакомились в предыдущей главе. Основные принципы следующие.

В функционировании многих белков важную роль играет обратимое связывание других молекул. Молекула, которая обратимо связывается с белком, называется **лигандом**. Лигандом может быть любая молекула, в том числе и другой белок. Краткосрочность взаимодействия белка с лигандом имеет важнейшее значение для жизни, поскольку позволяет организму быстро и обратимо реагировать на изменение внешних условий и метаболических процессов.

Участок связывания лиганда на молекуле белка называется **центром связывания**; он подходит соответствующему лиганду по размеру, форме, заряду, а также по гидрофильности (гидрофобности). Кроме того, это взаимодействие явля-

ется специфическим: белок связывается всего с одним или несколькими типами молекул из множества окружающих его самых разных соединений. Молекула белка может иметь центры связывания для нескольких различных лигандов. Подобные специфические взаимодействия играют важнейшую роль в поддержании упорядоченности в живых системах. Сейчас мы не будем обсуждать связывание воды, которая может участвовать в слабых и неспецифических взаимодействиях с белками. В гл. 6 мы отдельно остановимся на роли воды как специфического лиганда для многих ферментов.

Молекулы белков обладают большой гибкостью. Изменения их конформации могут быть едва различимыми и являться результатом внутримолекулярных колебаний и незначительных перемещений аминокислотных остатков в молекуле. Подобные изменения конформации иногда называют «дыханием» белка. Однако возможны и довольно резкие изменения конформации, при которых основные структурные элементы могут сдвигаться на несколько нанометров. Специфические конформационные изменения очень часто играют ключевую роль в функционировании белка.

Связывание белка с лигандом часто сопряжено с конформационными изменениями в молекуле белка, в результате которых достигается лучшая совместимость лиганда с центром связывания, а следовательно, и более надежное связывание. Структурные перестройки, которыми сопровождается взаимодействие белка с лигандом, называют **индуцированным соответствием**.

В белках, состоящих из нескольких субъединиц, конформационные изменения в одной субъединице часто влекут за собой изменения в другой субъединице.

Взаимодействие лигандов с белками может регулироваться, что обычно достигается посредством специфических взаимодействий с еще одним или несколькими лигандами. Эти дополнительные лиганды могут вызывать конформационные изменения в молекуле белка, влияющие на связывание первого лиганда.

Говоря о функциях белков, следует отдельно остановиться на ферментах. Ферменты связывают другие молекулы и способствуют их превращениям, т. е. катализируют реакции. Молекулы, подвергающиеся изменениям в ферментативных реакциях, называют лигандами, а **субстратами**, а участок молекулы фермента, где протекает ферментативная реакция, называют **каталитическим** или **активным центром**. В данной главе мы не будем останавливаться на каталитических функциях белков — этому важнейшему разделу биохимии посвящена гл. 6. Основные темы этой главы, а именно связывание, специфичность и конформационные изменения, будут развиваться в следующей главе в приложении к белкам, участвующим в химических превращениях.

5.1. Обратимое связывание белков с лигандами: белки, связывающие кислород

Возможно, миоглобин и гемоглобин являются наиболее хорошо изученными белками; для них впервые была определена трехмерная структура. Наши сегодняшние знания об этих белках — результат исследований, которые на протяжении нескольких десятилетий проводили тысячи биохимиков. Важно отметить, что на примере этих белков можно проиллюстрировать практически все ключевые аспекты основного биохимического процесса — обратимого связывания лиганда с белком. Эти классические модельные белки могут многое рассказать о том, как белки функционируют. 📖 **Кислородсвязывающий белок миоглобин и депонирование кислорода**

Кислород связывается с протетической группой — гемом

Кислород плохо растворяется в воде (табл. 2-3), и, если бы сыворотка крови содержала только растворенный кислород, то его поступление в ткани было бы недостаточным. Кроме того, в тканях диффузия кислорода на расстояния свыше нескольких миллиметров также неэффективна. Эволюция крупных многоклеточных организмов связана с возникновением белков, способных запасать и переносить кислород.

Однако боковая цепь ни одной аминокислоты не годится для обратимого связывания молекулы кислорода. Эту функцию выполняют некоторые переходные металлы, в том числе железо и медь, обладающие высоким сродством к кислороду. Поэтому многоклеточные организмы используют для транспорта кислорода ионы металлов, чаще всего железа. В присутствии свободных ионов железа образуются очень реакционно-способные соединения кислорода, такие как гидроксильные радикалы, вызывающие повреждения ДНК и других макромолекул. Поэтому клетки используют железо в связанной форме, в которой оно менее активно. У многоклеточных организмов, особенно тех, в которых комплекс железа с кислородом должен переноситься на большие расстояния, железо часто встроено в связанную с белком простетическую группу — **гем**. (В гл. 3 мы определили простетическую группу как связанное с белком соединение, необходимое для выполнения специфической функции.)

Гем представляет собой сложную циклическую структуру, называемую **протопорфирином**, с которой связан ион железа Fe^{2+} (рис. 5-1). Атом железа имеет шесть координа-

ционных связей: четыре связи с атомами азота в составе плоского **порфиринового кольца** и две связи, направленные перпендикулярно плоскости порфиринового кольца. Координационная связь с электронодонорными атомами азота препятствует окислению гемового железа до состояния Fe^{3+} . Железо в форме Fe^{2+} обратимо связывает молекулу кислорода, а железо в форме Fe^{3+} не связывает кислород. Гем обнаружен в целом ряде белков, отвечающих за перенос кислорода, а также в некоторых белках, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях, например в цитохромах (гл. 19).

В гемовой группе, не связанной с белком, Fe^{2+} имеет две свободные координационные связи. Взаимодействие молекулы O_2 с двумя молекулами гема (или двумя свободными ионами Fe^{2+}) может привести к необратимому превращению Fe^{2+} в Fe^{3+} . В гемсодержащих белках эта реакция не происходит, поскольку каждый гем спрятан глубоко внутри белковой структуры и доступ к двум свободным координационным связям железа затруднен. Одна из этих связей направлена на атом азота боковой цепи остатка His. Другая служит центром связывания молекулярного

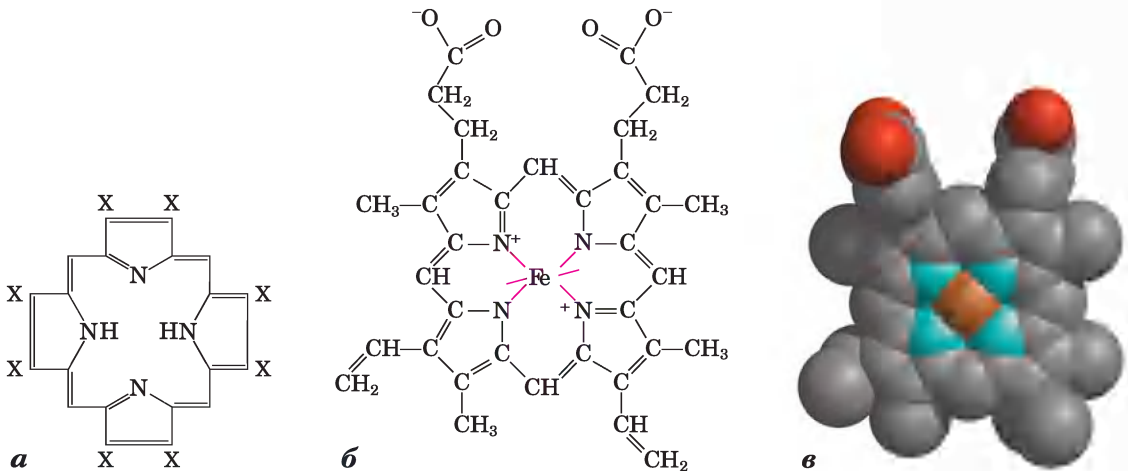
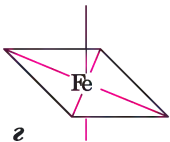


Рис. 5-1. Структура гема. Гем обнаружен в молекулах миоглобина, гемоглобина и других белков — гемопroteинов. Гем представляет собой сложную полициклическую структуру (протопорфирин IX), с которой связан атом железа в форме Fe^{2+} . а) Порфирин IX является лишь одним представителем класса порфиринов, молекулы которых состоят из пиррольных колец, связанных метиновыми мостиками и несущих заместители в положениях, обозначенных буквой X. б и в) Два способа изображения гема (PDB ID 1CCR). з) Атом железа в геме имеет шесть координационных связей: четыре расположены в плоскости порфиринового кольца и связаны с ним, а две направлены перпендикулярно этой плоскости.



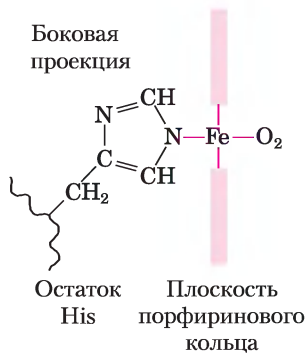


Рис. 5-2. Координационные связи гемового железа (вид сбоку). Две координационные связи Fe²⁺ направлены перпендикулярно плоскости порфиринового кольца. Одна из этих связей направлена на азот остатка His, иногда называемого проксимальным гистидином. Другая связь является центром связывания молекулы кислорода. Остальные четыре связи расположены в плоскости порфиринового кольца и связаны с ним.

кислорода (O₂) (рис. 5-2). При связывании кислорода свойства гемового железа изменяются; это, в частности, служит причиной изменения темно-красной окраски венозной крови на светло-красную окраску богатой кислородом артериальной крови. Некоторые небольшие молекулы, такие как монооксид углерода (CO) и монооксид азота (NO), имеют более высокое сродство к гемовому железу, чем молекула кислорода. При связывании с гемом молекулы CO происходит высвобождение O₂, вот почему CO (угарный газ) так токсичен для аэробных организмов (подробнее см. доп. 5-1). Окружая и изолируя гем, кислородсвязывающие белки регулируют доступ к нему CO и других небольших молекул.

В миоглобине один участок связывания кислорода

Миоглобин (Mb) имеет молекулярную массу 16 700 и является сравнительно несложно устроенным кислородсвязывающим белком, обнаруженным практически у всех млекопитающих преимущественно в мышечной ткани. Он служит транспортным белком, облегчающим доставку кислорода к мышцам. Особенно богаты миоглобином мышцы морских млекопитающих, например тюленей и китов; этим животным, проводящим длительное время под водой, миоглобин позволя-

ет запастись необходимым количеством кислорода. Аналогичные миоглобину белки очень широко распространены и встречаются даже у некоторых одноклеточных организмов.

Миоглобин представляет собой единственную полипептидную цепь из 153 аминокислотных остатков, связанную с одной молекулой гема. Он является типичным представителем семейства **глобинов**, все члены которого имеют сходные первичную и третичную структуры. Полипептидная цепь миоглобина образует восемь α -спиральных участков, соединенных петлями (рис. 5-3). В α -спиральных участках сосредоточено около 78% аминокислотных остатков.

Любое детальное исследование функции белка обязательно связано с определением его структуры. На примере миоглобина мы обсудим некоторые особенности глобиновых белков. Как видно из рис. 5-3, спиральные участки молекулы обозначе-

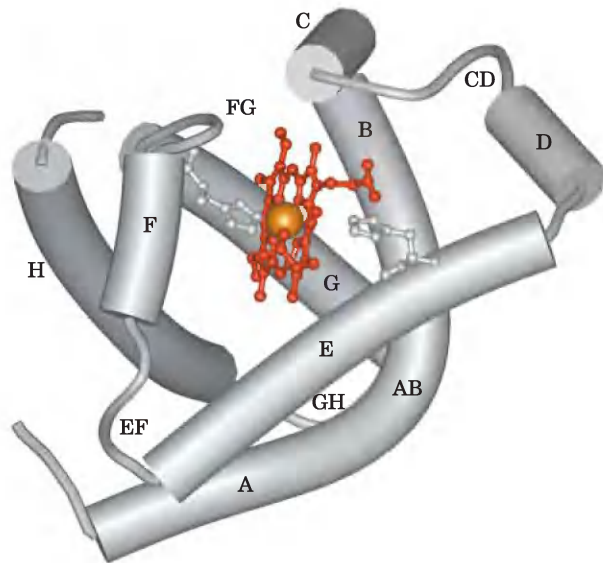


Рис. 5-3. Миоглобин (PDB ID 1MB0). Восемь α -спиральных участков молекулы (изображены в виде цилиндров) обозначены латинскими буквами от А до Н. Связующие участки обозначены как АВ, CD, EF и т. д. по названию тех спиралей, которые они соединяют. Некоторые связующие участки, такие как ВС или DE, очень короткие и не содержат ни одного остатка; обычно при изображении молекулы их не называют. (Имеющий некоторую протяженность участок между спиральями D и E в данном случае является артефактом компьютерного моделирования.) Гем связан в кармане, образованном главным образом спиральями E и F, хотя аминокислотные остатки других участков также задействованы в его формировании.

ны буквами от А до Н. Отдельные аминокислотные остатки обозначены в соответствии с их позицией либо во всей полипептидной последовательности, либо в определенном α -спиральном участке. Например, в молекуле миоглобина остаток гистидина, связанный координационной связью с гемовым железом, обозначен как His⁹³ (93-й аминокислотный остаток, считая от N-конца полипептидной цепи миоглобина); иначе он же обозначается как His F8 (восьмой остаток в α -спирали F). Петли между спиральными участками указываются в соответствии с названиями соединяемых ими спиралей, например AB, CD, EF, FG и т. д.

Количественное описание взаимодействия белков с лигандами

Для выполнения своей функции миоглобин должен быть способен не только связывать кислород, но и высвобождать его по мере необходимости. При многих химических процессах происходят подобного рода обратимые взаимодействия белка и лиганда. Таким образом, количественное описание взаимодействия белка и лиганда является ключевым моментом многих биохимических исследований.

В общем случае обратимое связывание белка (P) и лиганда (L) может быть описано простой обратимой реакцией:



Эта реакция, которая характеризуется константой равновесия K_a :

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d} \quad (5-2)$$

где k_a и k_d — это константы скорости (подробнее о них будет сказано ниже). Константа K_a — **константа ассоциации** (не путайте с константой диссоциации кислоты; с. 94), описывающая равновесие между комплексом и составляющими его компонентами в свободном состоянии. Константа ассоциации измеряется в M^{-1} ; чем больше значение этой константы, тем выше сродство лиганда и белка.

Константа равновесия K_a равна отношению скоростей прямой (образование комплекса) и обратной (диссоциация комплекса) реакций. Реакция образования комплекса описывается константой скорости k_a , а реакция диссоциации — константой скорости k_d . Как мы обсудим в следующей главе, константы скорости являются

константами пропорциональности, определяющими долю вещества, реагирующего за данный промежуток времени. Если в реакции участвует одна молекула, как при диссоциации $PL \rightarrow P + L$, это реакция *первого порядка*, а соответствующая константа скорости (k_d) имеет размерность обратного времени (s^{-1}). Если реагируют две молекулы, как при образовании комплекса $P + L \rightarrow PL$, такая реакция называется реакцией *второго порядка*, а размерность соответствующей константы скорости (k_a) — $M^{-1} s^{-1}$.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Константы равновесия принято обозначать заглавной буквой K , а константы скорости — строчной k . ■

Если обе части уравнения 5-2 умножить на концентрацию лиганда, видно, что отношение концентраций связанного и свободного белка прямо пропорционально концентрации свободного лиганда:

$$K_a [L] = \frac{[PL]}{[P]} \quad (5-3)$$

Если концентрация лиганда многократно превышает количество центров связывания лиганда на молекулах белка, то связывание лиганда с белком практически не влияет на концентрацию свободного (несвязанного) лиганда, т. е. $[L]$ остается постоянной. Это допущение применимо к большинству лигандов, связывающихся с белками в клетке, и значительно упрощает наши вычисления.

Теперь мы можем ввести параметр θ (тета), отражающий долю занятых центров связывания лиганда в молекуле белка:

$$\begin{aligned} \theta &= \frac{(\text{число занятых центров связывания})}{(\text{общее число центров связывания})} = \\ &= \frac{[PL]}{([PL] + [P])} \end{aligned} \quad (5-4)$$

Подставив вместо $[PL]$ произведение $K_a [P][L]$ (см. уравнение 5-3) и сделав некоторые преобразования, получаем:

$$\begin{aligned} \theta &= \frac{K_a [L][P]}{K_a [L][P] + [P]} = \frac{K_a [L]}{K_a [L] + 1} = \\ &= \frac{[L]}{[L] + \frac{1}{K_a}} \end{aligned} \quad (5-5)$$

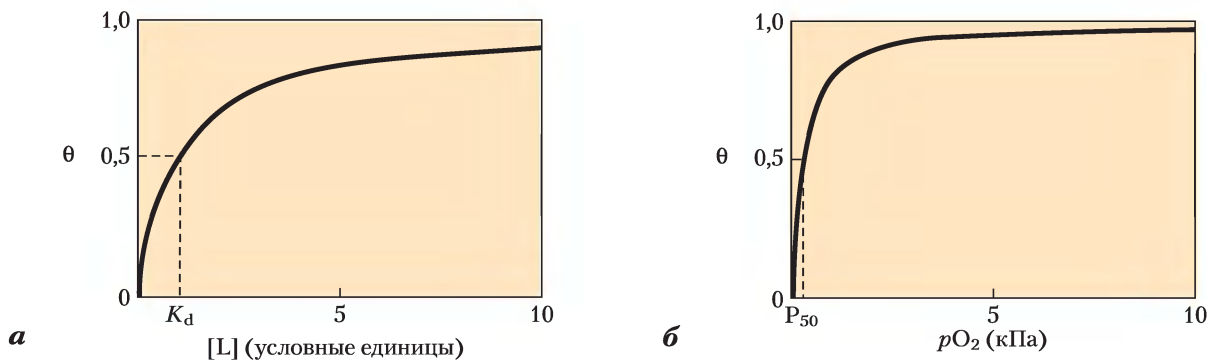


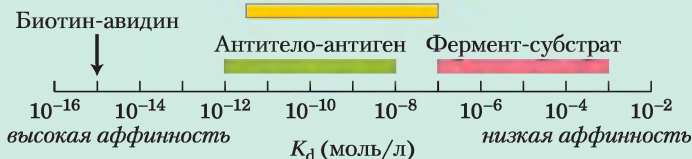
Рис. 5-4. Изучение связывания лиганда. Представлена зависимость доли занятых центров связывания лиганда (θ) от концентрации свободного лиганда. Обе кривые описываются гиперболическим уравнением. *а*) Кривая связывания гипотетического лиганда L. Концентрация лиганда, при которой занята половина центров связывания, соответствует $1/K_a$ или K_d . Кривая имеет горизонтальную асимптоту при $\theta = 1$ и вертикальную асимптоту при $[L] = -1/K_a$ (не показана). *б*) Кривая связывания кислорода с миоглобином. Парциальное давление кислорода в газовой фазе над раствором выражено в килопаскалях (кПа). Кислород имеет высокое сродство к миоглобину, поэтому значение P_{50} составляет всего 0,26 кПа.

Таблица 5-1 Константа диссоциации некоторых комплексов с лигандами*

Белок	Лиганд	K_d (М)
Авидин (яичный белок)**	Биотин	$1 \cdot 10^{-15}$
Рецептор инсулина (человека)	Инсулин	$1 \cdot 10^{-10}$
Анти-ВИЧ антитела (человека)	gp41 (поверхностный антиген ВИЧ-1)	$4 \cdot 10^{-10}$
Никельсвязывающий белок (<i>E. coli</i>)	Ni^{2+}	$1 \cdot 10^{-7}$
Кальмодулин (крысы)***	Ca^{2+}	$3 \cdot 10^{-6}$ $2 \cdot 10^{-5}$

Стандартные взаимодействия лиганд-рецептор

Специфичные к последовательности взаимодействия белок-ДНК



Цветные полосы означают диапазон значений констант диссоциации при некоторых типичных взаимодействиях в биологических системах. Несколько реакций, такие как взаимодействие белка авидина и кофактора ферментов биотина, выходят за рамки нормального диапазона. Связывание авидина с биотином такое прочное, что реакцию можно считать необратимой. Специфичное к последовательности взаимодействие белка с ДНК характеризует белки, связывающиеся с определенной последовательностью нуклеотидов в ДНК, в отличие от обычного связывания с произвольным участком ДНК.

* Данные значения констант диссоциации верны только в тех конкретных условиях, в которых они были определены. Значения K_d могут сильно изменяться (иногда на несколько порядков) при изменении концентрации солей и pH раствора, а также некоторых других параметров.

** Связь авидина с биотином (кофактором ферментов) является одной из наиболее прочных нековалентных связей, известных в биохимии на сегодняшний день.

*** Кальмодулин имеет четыре центра связывания кальция. Здесь приведены значения K_d для центров связывания с наибольшим и наименьшим сродством, полученные в одном эксперименте.

Значение K_a можно определить из графика зависимости θ от концентрации свободного лиганда ($[L]$), как показано на рис. 5-4, а. Графиком любого уравнения вида $x = y/(y + z)$ является гипербола, таким образом, θ представляет собой гиперболическую функцию $[L]$. По мере увеличения $[L]$ доля занятых центров связывания асимптотически стремится к единице (насыщение). Концентрация лиганда, при которой занята половина центров связывания ($\theta = 0,5$), соответствует $1/K_a$.

Чаще используют более понятный параметр — константу диссоциации $K_d = 1/K_a$. Константа K_d измеряется в молях и характеризует реакцию высвобождения лиганда, т. е. диссоциацию комплекса PL:

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (5-6)$$

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_d} \quad (5-7)$$

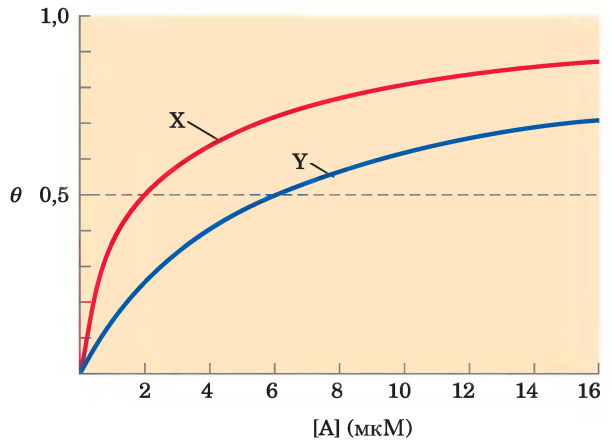
$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (5-8)$$

При $[L] = K_d$ занята половина центров связывания лиганда. По мере снижения $[L]$ все меньшая доля белка связывает лиганд. Для связывания лиганда в 90% доступных центров связывания значение $[L]$ должно в девять раз превышать K_d .

На практике как меру сродства белка к лиганду константу K_d используют гораздо чаще, чем K_a . Заметьте, что чем меньше K_d , тем выше сродство белка к лиганду. Математические выкладки привели нас к простому утверждению: константа K_d равна молярной концентрации лиганда, при которой занята половина доступных центров связывания. В данной точке наблюдается полунасыщение белка лигандом. Чем выше сродство белка к лиганду, тем меньше концентрация лиганда, необходимая для достижения полунасыщения, т. е. тем меньше K_d . Некоторые значения констант диссоциации представлены в табл. 5-1; на масштабной линейке нанесены типичные для биологических систем значения констант диссоциации.

Пример 5-1 КОНСТАНТЫ ДИССОЦИАЦИИ КОМПЛЕКСА «РЕЦЕПТОР-ЛИГАНД»

Два белка X и Y связывают один и тот же лиганд A; кривые связывания приведены ниже.



Какова константа диссоциации K_d для каждого белка? Какой белок (X или Y) обладает более высоким сродством к лиганду A?

Решение. Константы диссоциации можно найти из графиков. Если θ представляет собой долю центров связывания, занятых лигандом, то концентрация лиганда, при которой занята половина центров связывания (т. е. $\theta = 0,5$), соответствует константе диссоциации K_d . В случае белка X $K_d = 2$ мкМ; в случае белка Y $K_d = 6$ мкМ. Поскольку половина насыщения X достигается при более низкой концентрации лиганда $[A]$, его сродство к лиганду выше, чем сродство белка Y.

Связывание кислорода с миоглобином подчиняется описанным выше закономерностям. Однако, поскольку кислород — газ, мы должны несколько видоизменить наши уравнения для удобства их использования в лабораторной практике. Для начала вместо концентрации лиганда в уравнение 5-8 подставим концентрацию растворенного кислорода:

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + K_d} \quad (5-9)$$

Как и для любого другого лиганда, константа K_d равна концентрации кислорода, при которой занята половина центров связывания миоглобина.

Обозначим эту концентрацию через $[O_2]_{0,5}$. Уравнение 5-9 примет вид:

$$\theta = \frac{[O_2]}{[O_2] + [O_2]_{0,5}} \quad (5-10)$$

В тех случаях, когда в качестве лиганда выступает кислород, изменяемым параметром является парциальное давление кислорода (pO_2) в газовой фазе над раствором, поскольку его легче контролировать, чем концентрацию растворенного кислорода в жидкой фазе. Концентрация летучего вещества в растворе всегда пропорциональна его парциальному давлению в газовой фазе. Таким образом, если мы обозначим парциальное давление кислорода при его концентрации $[O_2]_{0,5}$ как P_{50} и произведем замены в уравнении 5-10, то получим следующее выражение:

$$\theta = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}} \quad (5-11)$$

Кривая связывания миоглобина с кислородом в координатах θ от pO_2 представлена на рис. 5-4, б.

Структура белка влияет на связывание с лигандом

Связывание лиганда с белком редко осуществляется так просто, как может показаться при рассмотрении уравнения реакции. Это взаимодействие в значительной степени зависит от структуры белка и часто сопровождается конформационными изменениями. Например, специфичность связывания гема с лигандами изменяется, когда он встроен в молекулу миоглобина. Сродство монооксида углерода CO к свободному гему в 20 000 раз превышает сродство кислорода (т. е. K_d или P_{50} для связывания CO со свободным гемом в 20 000 раз ниже, чем соответствующие значения для кислорода), однако сродство CO к гему в составе миоглобина лишь в 200 раз выше сродства кислорода. Это различие частично объясняется стерическими факторами. При связывании O_2 со свободным гемом ось молекулы кислорода расположена под углом к связи Fe—O (рис. 5-5, а). Напротив, при связывании CO со свободным гемом все три атома — Fe, C и O — расположены на одной прямой (рис. 5-5, б). В обоих случаях образование связи определяется геометрией гибридных орбиталей каждого лиганда. Когда гем связан с миоглоби-

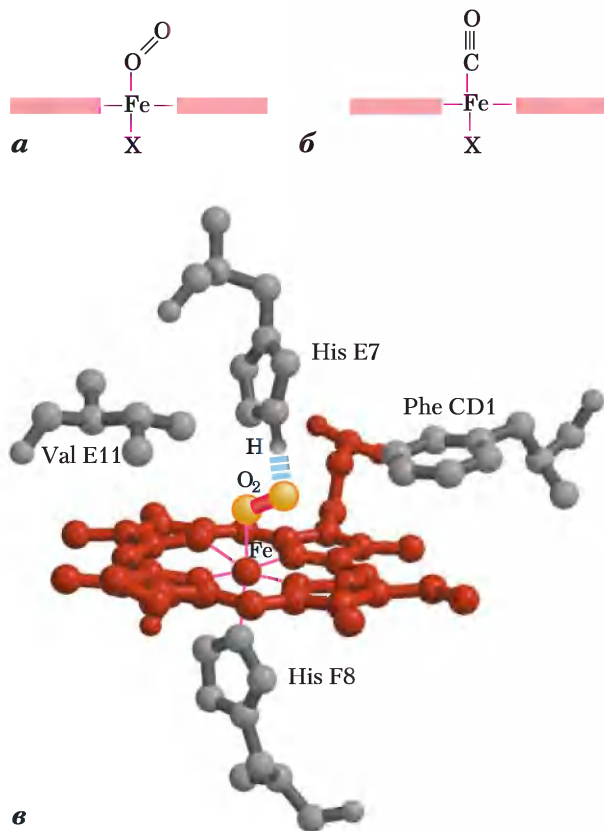



Рис. 5-5. Стерические эффекты при связывании лигандов с гемом в составе миоглобина. а) При связывании кислорода с гемом ось молекулы O_2 расположена под углом к порфириновому кольцу, что вполне допускает конформация миоглобина. б) При связывании монооксида углерода со свободным гемом ось молекулы CO перпендикулярна плоскости порфиринового кольца. При связывании с гемом в составе миоглобина молекула CO должна немного изогнуться, поскольку ее вертикальному положению мешает остаток His E7 (дистальный His). Это ухудшает связывание CO с миоглобином. в) Еще один способ представления гема в составе миоглобина (PDB ID 1MBO), демонстрирующий расположение ключевых аминокислотных остатков. Молекула O_2 образует водородную связь с дистальным His (His E7 или His⁶⁴), что еще более облегчает связывание кислорода.

ном, остаток His⁶⁴ (His E7) на O_2 -связывающей стороне гема расположен слишком далеко, чтобы координировать гемовое железо, но тем не менее способен взаимодействовать с лигандом гема. Этот остаток, называемый *дистальным гистидином*, образует водородную связь с молекулой O_2 (рис. 5-5, в), но может препятствовать

линейному связыванию СО, что и объясняет относительное снижение сродства СО к гемму в составе миоглобина (и гемоглобина). Эта особенность строения имеет важное физиологическое значение, поскольку СО является минорным побочным продуктом клеточного метаболизма. Возможно, существуют и какие-то другие факторы, модулирующие взаимодействие гема с СО в данных белках.

Связывание кислорода с гемом в миоглобине зависит, кроме того, от валентных колебаний в молекуле белка. Гем спрятан глубоко внутри белковой глобулы, так что кислород не может напрямую проникнуть из раствора к центру связывания. Если бы белок имел жестко фиксированную структуру, кислород не мог бы в заметных количествах связываться в комплекс с гемом или высвободиться из него. Но быстрые изгибы боковых цепей аминокислотных остатков способствуют кратковременному образованию пор в структуре белка, позволяющих кислороду проникать внутрь глобулы и выходить наружу. Компьютерное моделирование быстрых структурных флуктуаций в молекуле миоглобина подтверждает существование нескольких подобных путей. Один из основных путей открывается при вращении боковой цепи дистального His (His E7), происходящем во временном интервале нескольких наносекунд (10^{-9} с). Этот факт еще раз подтверждает, что даже едва заметные конформационные изменения могут иметь решающее значение для активности белка.

Гемоглобин переносит кислород в крови

 **Кислородсвязывающий белок гемоглобин — транспорт кислорода.** Практически весь кислород, транспортируемый кровью в организме животных, связан с гемоглобином и переносится с его помощью в составе эритроцитов (красных кровяных клеток). Нормальные эритроциты человека представляют собой небольшие двояковогнутые диски диаметром от 6 до 9 мкм. Они образуются из стволовых клеток-предшественников — **гемоцитобластов**. В процессе созревания стволовые клетки образуют дочерние клетки, которые синтезируют большое количество гемоглобина и теряют ряд внутриклеточных органелл — ядро, митохондрии и эндоплазматический ретикулум. Таким образом, эритроциты

представляют собой неполноценные, рудиментарные клетки, не способные к самовоспроизведению, которые в организме человека живут не более 120 дней. Основная функция эритроцитов — это перенос гемоглобина, растворенного в цитозоле в высокой концентрации (массовая доля около 34%).

В артериальной крови, проходящей от легких через сердце к периферическим тканям, гемоглобин примерно на 96% насыщен кислородом. В венозной крови, возвращающейся к сердцу, гемоглобин насыщен кислородом лишь на 64%. Таким образом, каждые 100 мл крови оставляют в тканях около одной трети содержащегося в крови кислорода, т. е. 6,5 мл газообразного O_2 (при атмосферном давлении и температуре тела).

Кривая связывания кислорода миоглобином — гипербола (рис. 5-4, б). Миоглобин сравнительно малочувствителен к небольшим изменениям концентрации растворенного кислорода и потому может использоваться в качестве хранилища (депо) кислорода. Гемоглобин, состоящий из нескольких субъединиц и имеющий несколько центров связывания O_2 , лучше приспособлен для транспортировки кислорода. Как мы увидим далее, взаимодействие между субъединицами мультимерного белка способствует его высокой чувствительности к небольшим изменениям концентрации лиганда. Взаимодействие между субъединицами гемоглобина вызывает конформационные изменения, которые в свою очередь изменяют сродство белка к кислороду. Регулирование связывания O_2 позволяет белкам, транспортирующим кислород, реагировать на изменения потребностей тканей в кислороде.

Субъединицы гемоглобина имеют структуру, сходную со структурой миоглобина

Гемоглобин (Hb) имеет молекулярную массу 64 500 и представляет собой практически сферическую молекулу диаметром около 5,5 нм. Этот тетрамерный белок содержит четыре простетические гемовые группы, каждая из которых соединена с одной полипептидной цепью. Гемоглобин взрослого человека состоит из глобинов двух типов — двух α -цепей (каждая содержит 141 аминокислотный остаток) и двух β -цепей (по 146 аминокислотных остатков). Хотя аминокислотные последовательности α - и

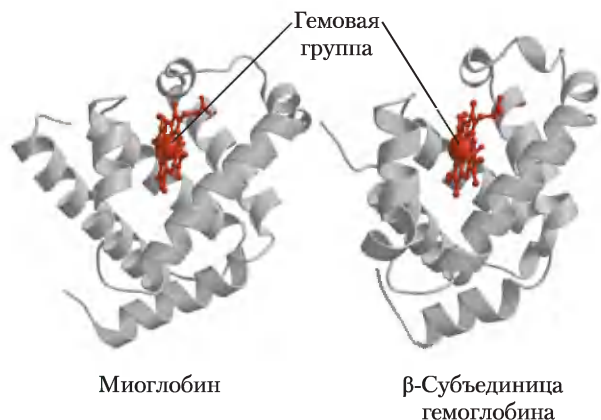


Рис. 5-6. Сравнение структуры миоглобина (PDB ID 1MBO) и β-субъединицы гемоглобина (PDB ID 1HGA).

β-субъединиц совпадают менее чем на 50%, трехмерные структуры этих двух субъединиц очень похожи. Более того, их конформация очень напоминает структуру миоглобина (рис. 5-6), несмотря на то что три полипептидные последовательности имеют идентичные аминокислотные остатки лишь в 27 позициях (рис. 5-7). Все три полипептида относятся к семейству глобинов. Правила обозначения спиральных участков, описанные выше для миоглобина, применимы и

Рис. 5-7. Сравнение аминокислотных последовательностей миоглобина кита и α- и β-субъединиц гемоглобина человека. Пунктирными линиями помечены границы спиральных участков. Для оптимального выравнивания в обе последовательности Нб необходимо ввести короткие пробелы. За исключением отсутствующей спирали D в Нб_α, все остальные спиральные участки можно именовать в соответствии с существующими договоренностями, что подчеркивает одинаковое расположение идентичных аминокислотных остатков во всех трех структурах (выделены цветом). Розовым цветом выделены аминокислотные остатки, которые идентичны во всех известных глобинах. Заметьте, что аминокислотные остатки с одинаковыми буквенно-численными обозначениями не обязательно находятся в одинаковых позициях в линейных полипептидных последовательностях. Например, дистальный остаток His во всех трех последовательностях называется His E7, но в последовательностях Мб, Нб_α и Нб_β он представляет собой His⁶⁴, His⁵⁸ и His⁶³ соответственно. Не входящие в состав спиралей аминокислотные остатки, расположенные за пределами первого (А) и последнего (Н) α-спирального участка на N- и C-концах последовательности, обозначаются как NA и HC соответственно.

к полипептидам гемоглобина, за исключением того, что его α-субъединица не имеет короткой спирали D. Гемсвязывающий карман сформирован в каждой субъединице главным образом спиралями E и F.

Четвертичная структура гемоглобина характеризуется сильным взаимодействием между

	Мб	Нб _α	Нб _β		Мб	Нб _α	Нб _β
NA1	--1V	--1V	--1V		K	A	A
	--	--	--		K	H	H
	--L	--L	--L		K	V	L
A1	---S	---S	---T		⁸⁰ G	D	D
	---E	---P	---P		H	D	⁸⁰ N
	---G	---A	---E		H	M	L
	---E	---D	---E		E	P	K
	---W	---K	---K		A	N	G
	---Q	---T	---S		E	A	T
	---L	---N	---A	F1	---L	⁸⁰ L	F
	---V	---V	---V		K	S	A
	---L	---K	---T		P	A	T
	---H	---A	---A		L	L	L
	---V	---A	---L		A	S	S
	---W	---W	---W		Q	D	E
	---A	---G	---G		S	L	L
	---K	---K	---K	Прокси- F8	H	H	H
	---V	---V	---V	малый F9	---A	A	C
A16	---E	---G	---	His	---T	H	D
	---A	---A	---		K	K	K
B1	---20D	²⁰ H	---N		H	L	L
	---V	---A	²⁰ V		K	R	H
	---A	---G	---D		I	V	V
	---G	---E	---E		I	D	D
	---H	---Y	---V		K	V	E
	---G	---G	---G		Y	N	N
	---Q	---A	---G		L	F	F
	---D	---E	---E		E	K	R
	---I	---A	---A		F	¹⁰⁰ L	L
	---L	---L	---L		I	L	L
	---I	---E	---G		S	S	G
	---R	---R	---R		E	H	N
	---L	---M	---L		A	C	V
	---F	---F	---L		I	L	L
	---K	---L	---V		I	L	V
B16	---S	---S	---Y		H	V	C
C1	---H	---F	---V		V	T	V
	---P	---P	---P		L	L	L
	---E	---T	---W		H	A	A
	---T	---T	---T		S	A	H
	⁴⁰ L	⁴⁰ K	⁴⁰ Q	G19	---R	H	H
	---E	---T	⁴⁰ R		H	L	F
C7	---K	---Y	---F		¹²⁰ P	P	G
	---F	---F	---F		G	A	¹²⁰ K
	---D	---P	---E		D	E	E
	---R	---H	---S		F	F	F
	---F	---F	---F		H1	---G	T
	---K	---	---G		A	P	P
	---H	---D	---D		D	¹²⁰ A	P
	---L	---L	---L		A	V	V
D1	---T	---H	---T		Q	H	Q
	---E	---	---P		G	A	A
	---A	---	---D		A	S	A
	---E	---	---A		M	L	Y
	---M	---	---V		N	D	Q
	---K	---	---M		K	K	K
D7	---A	---G	---G		A	F	V
E1	---S	---S	---N		L	L	V
	---E	---A	---P		E	A	A
	⁶⁰ D	---Q	---K		L	S	G
	---L	---V	⁶⁰ V		F	V	V
	---K	---K	---K		R	S	A
	---K	---G	---A		¹⁴⁰ K	T	N
E7	---H	---H	---H		D	V	¹⁴⁰ A
	---G	---G	---G		I	L	L
	---V	⁶⁰ K	---K		A	T	A
	---T	---K	---K		---A	S	H
	---V	---V	---V		K	K	---HC1
	---L	---A	---L		Y	¹⁴⁰ Y	---HC2
	---T	---D	---G		K	¹⁴¹ R	¹⁴⁶ H
	---A	---A	---A		E	---	---HC3
	---L	---L	---F		H26	---	---
	---G	---T	---S		G	---	---
	---A	---N	---D		Y	---	---
	---I	---A	---G		Q	---	---
E19	---L	---V	---L		¹⁶⁵ G	---	---

Только в Нб_α и Нб_β

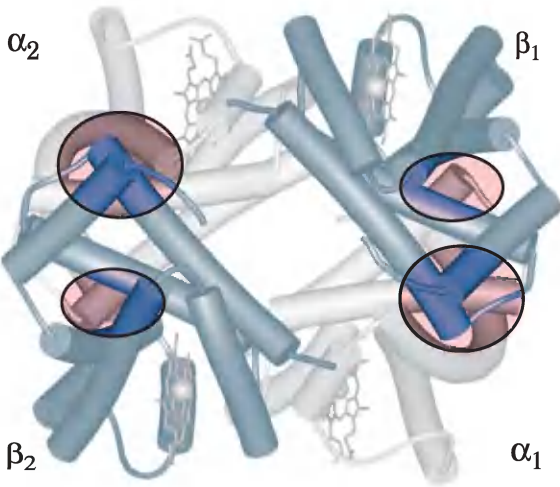


Рис. 5-8. Основные взаимодействия между субъединицами гемоглобина. α -Субъединицы изображены более светлыми, β -субъединицы — более темными. Наиболее сильное взаимодействие (выделено) наблюдается между субъединицами разных типов. Связывание кислорода слабо влияет на контакт $\alpha_1\beta_1$, однако в контакте $\alpha_2\beta_2$ наблюдаются значительные изменения с разрывом нескольких ионных пар (PDB ID 1HGA).

субъединицами разных типов. В зоне контакта $\alpha_1\beta_1$ (и аналогичным образом в зоне контакта $\alpha_2\beta_2$) расположено более 30 аминокислотных остатков, и это обеспечивает настолько высокую прочность взаимодействия, что, хотя при обработке гемоглобина мочевиной в сравнительно мягких условиях тетрамер распадается на два $\alpha\beta$ -димера, далее эти димеры не распадаются. В зоне контакта $\alpha_1\beta_2$ (и $\alpha_2\beta_1$) задействовано по 19 остатков (рис. 5-8). В местах контактов преобладают гидрофобные взаимодействия, однако образуются также водородные связи и ионные пары (иногда называемые солевыми мостиками), значение которых мы обсудим далее.

Связывание кислорода сопровождается структурными перестройками гемоглобина

Методом рентгеноструктурного анализа было показано наличие двух основных конформаций гемоглобина, называемых **R-** и **T-состояниями**. Кислород связывается с гемоглобином, находящимся в любом состоянии, но гораздо большее сродство он все же имеет к гемоглобину в состоянии R. Связывание с кислородом стабилизирует R-состояние.

Экспериментально показано, что в отсутствие кислорода более устойчиво состояние T и преобладает конформация **дезоксигемоглобина**. Буквы T и R исходно обозначали напряженную (англ. *tense*) и релаксированную (англ. *relaxed*) конформацию соответственно, поскольку состояние T стабилизировано большим количеством ионных пар, многие из которых расположены в зоне контакта $\alpha_1\beta_2$ (и $\alpha_2\beta_1$) (рис. 5-9). Связывание кислорода с субъединицей гемоглобина, находящейся в состоянии T, приводит к конформационным изменениям и переходу в состояние R. В результате изменения конформации всего белка структура отдельных субъединиц

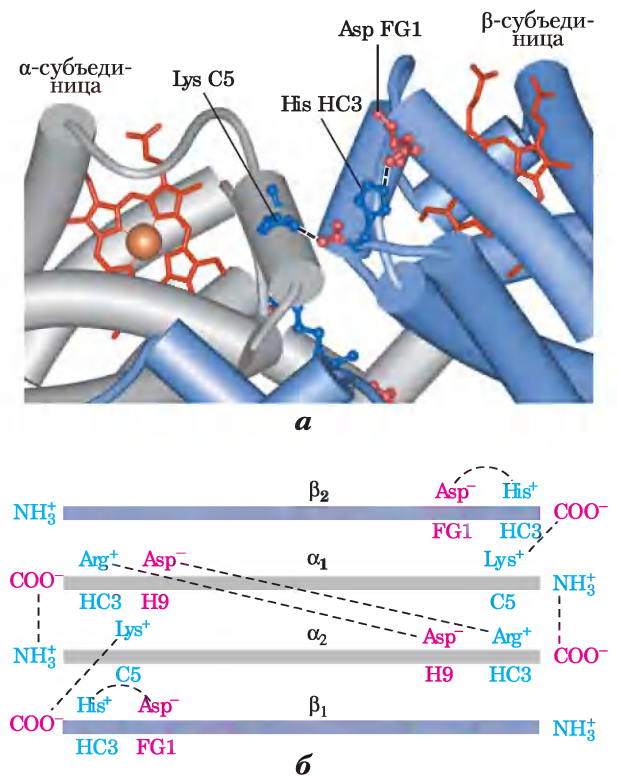


Рис. 5-9. Некоторые ионные пары, стабилизирующие состояние T дезоксигемоглобина. а) Крупный план фрагмента молекулы дезоксигемоглобина, находящейся в состоянии T (PDB ID 1HGA). Пунктирными линиями изображены ионные взаимодействия между His HC3 и Asp FG1 в β -субъединице (показана синим цветом), а также между Lys C5 в α -субъединице (показана серым цветом) и α -карбоксильной группой His HC3 в β -субъединице. (Вспомните, что HC3 представляет собой C-концевой остаток β -субъединицы.) б) Взаимодействия между указанными, а также другими ионными парами схематически изображены на линейных полипептидных цепях субъединиц гемоглобина.

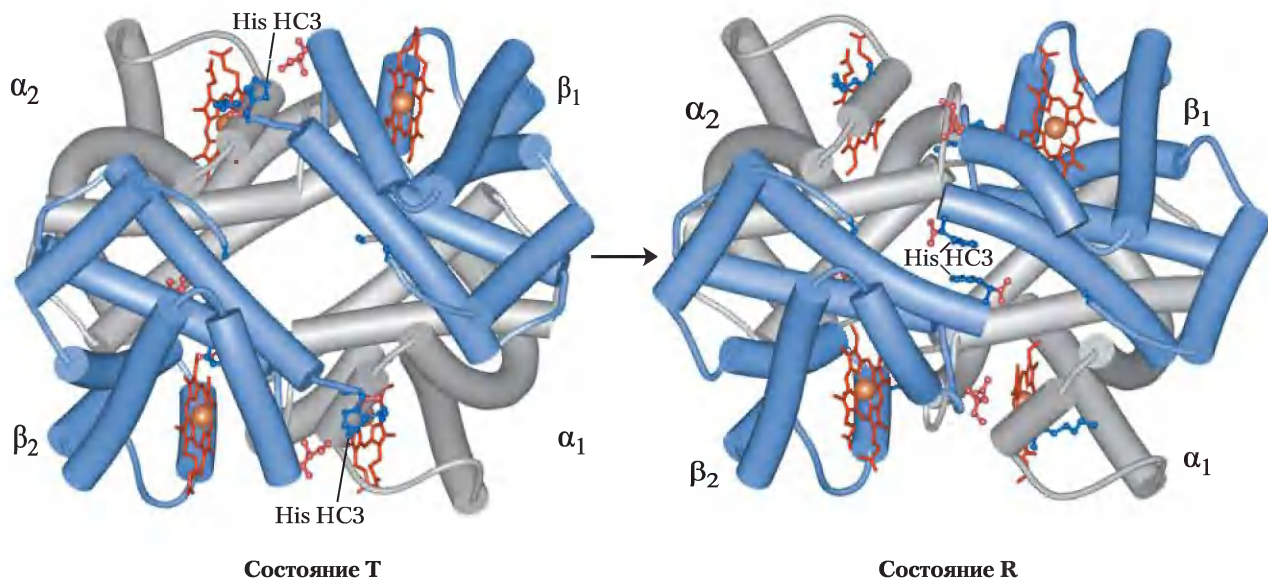


Рис. 5-10. Переход из состояния Т в состояние R (PDB ID 1HGA и 1BBB). β -Субъединицы изображены синим цветом, α -субъединицы — серым, как и на рис. 5-9. Положительно заряженные боковые цепи и концевые остатки, участвующие в образовании ионных пар, выделены синим цветом, а их отрицательно заряженные партнеры выделены красным цветом. Изображены, но не подписаны остатки Lys C5 в каждой α -субъединице и остатки Asp FG1 в каждой β -субъединице (ср. рис. 5-9, а). Заметьте, что молекулы повернуты несколько иначе, чем на рис. 5-9. Переход из состояния Т в состояние R сильно смещает пары субъединиц, вызывая изменения в некоторых ионных парах. Особенно важно, что остаток His HC3 на С-конце β -субъединицы, участвующий в образовании солевого мостика в состоянии Т, в состоянии R поворачивается к центру молекулы и не образует ионной пары. Еще одним важным результатом перехода Т \rightarrow R является сужение кармана между β -субъединицами.

изменяется слабо, однако пары $\alpha\beta$ -субъединиц скользят одна по другой и поворачиваются, так что расстояние между β -субъединицами уменьшается (**рис. 5-10**). При этом разрушаются некоторые ионные пары, стабилизирующие состояние Т, и образуются новые.

Макс Перутц предположил, что сигналом к осуществлению перехода Т \rightarrow R является изменение положения боковых цепей ключевых аминокислотных остатков, окружающих гем. В состоянии Т порфириновое кольцо несколько сжато, так что гемовое железо чуть выдвинуто в сторону проксимального гистидина (His F8). При связывании кислорода гем принимает более плоскую конформацию, что заставляет сдвинуться проксимальный His и F-спираль (**рис. 5-11**). Эти сдвиги приводят к корректировке ионных пар в зоне контакта $\alpha_1\beta_2$.

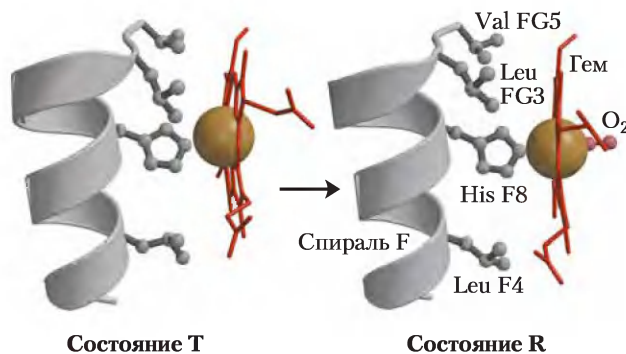


Рис. 5-11. Конформационные изменения в области гема при связывании кислорода с дезоксигемоглобином (PDB ID 1HGA и 1BBB). Сдвиг спирали F при связывании гема с молекулой O_2 считают одним из тех изменений в структуре молекулы, которые провоцируют переход Т \rightarrow R.

Связывание кислорода с гемоглобином — кооперативный процесс

Гемоглобин должен эффективно связывать кислород в легких, где pO_2 составляет приблизительно 13,3 кПа, и высвободить его в тканях, где pO_2 примерно равно 4 кПа. Миоглобин или любой другой белок, характеризующийся гиперболической кривой связывания с кислородом, не подходит для выполнения этой задачи по причинам, показанным на **рис. 5-12**. Белок, обладающий высоким сродством к кислороду, будет эффективно связывать его в легких, но не будет высвободить в тканях в достаточном количестве. Если белок имеет сравнительно низкое сродство к кислороду, позволяющее высвободить его в тканях, он не сможет связывать достаточное количество кислорода в легких.

В случае гемоглобина эта проблема решается путем перехода из низкоаффинного состояния (состояния Т) в высокоаффинное (состояние R)

по мере связывания молекул O_2 . В результате кривая связывания гемоглобина с кислородом имеет S-образный (сигмовидный) характер (рис. 5-12). Белок, состоящий из одной субъединицы с одним центром связывания лиганда, не может иметь S-образную кривую связывания, даже при условии, что это связывание сопровождается конформационными изменениями, поскольку каждая молекула лиганда связывается независимо и не может влиять на взаимодействие с другими молекулами. Напротив, присоединение O_2 к одной субъединице гемоглобина изменяет сродство к кислороду других субъединиц. Первая молекула O_2 , взаимодействующая с дезоксигемоглобином, связывается слабо, поскольку субъединица находится в состоянии Т. Но это взаимодействие приводит к конформационным изменениям, затрагивающим соседние субъединицы, в результате чего облегчается присоединение следующих молекул O_2 . Действительно, переход $T \rightarrow R$ во второй субъединице осуществляется быстрее, если в первой субъединице произошло связывание O_2 . Последняя (четвертая) молекула кислорода связывается с гемом в субъединице, уже находящейся в состоянии R, и поэтому сродство гемоглобина к четвертой молекуле кислорода гораздо выше, чем к первой.

Белок, в котором связывание лиганда в одном центре молекулы влияет на связывание в другом центре, называется **аллостерическим белком**. Термин «аллостерический» происходит от греческих слов *allos* («другой») и *stereos* («твердый» или «форма»). Таким образом, аллостерическими называют белки, принимающие «другую форму» или конформацию при связывании лигандов (модуляторов). Конформационные изменения, индуцированные модулятором (или модуляторами), представляют собой переходы между менее активной и более активной формами белка. Модуляторы аллостерических белков могут быть ингибиторами или активаторами. Если роль лиганда и модулятора выполняет одно и то же вещество, такое взаимодействие называют **гомотропным**, в противном случае взаимодействие называют **гетеротропным**. Некоторые белки имеют два или несколько модуляторов и, следовательно, могут участвовать как в гомотропных, так и в гетеротропных взаимодействиях.

Кооперативное связывание лиганда с мультимерным белком, подобное тому, какое мы наблюдали в случае взаимодействия гемоглобина

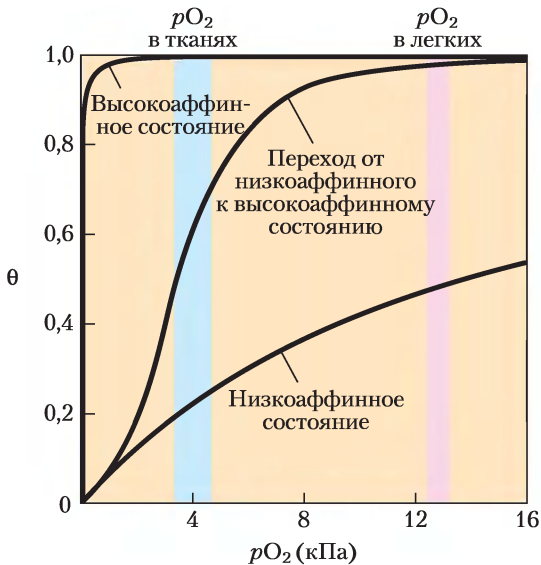


Рис. 5-12. Сигмовидная кривая, отражающая кооперативность связывания. Сигмовидную (S-образную) кривую можно рассматривать как гибридную кривую, отражающую переход от низкоаффинного к высокоаффинному состоянию. Сигмовидная кривая свидетельствует о том, что кооперативное связывание делает гемоглобин более чувствительным к небольшим изменениям концентрации O_2 между тканями и легкими. В результате становится возможным связывание кислорода в легких (где парциальное давление кислорода высокое) и его высвобождение в тканях (где pO_2 низкое).

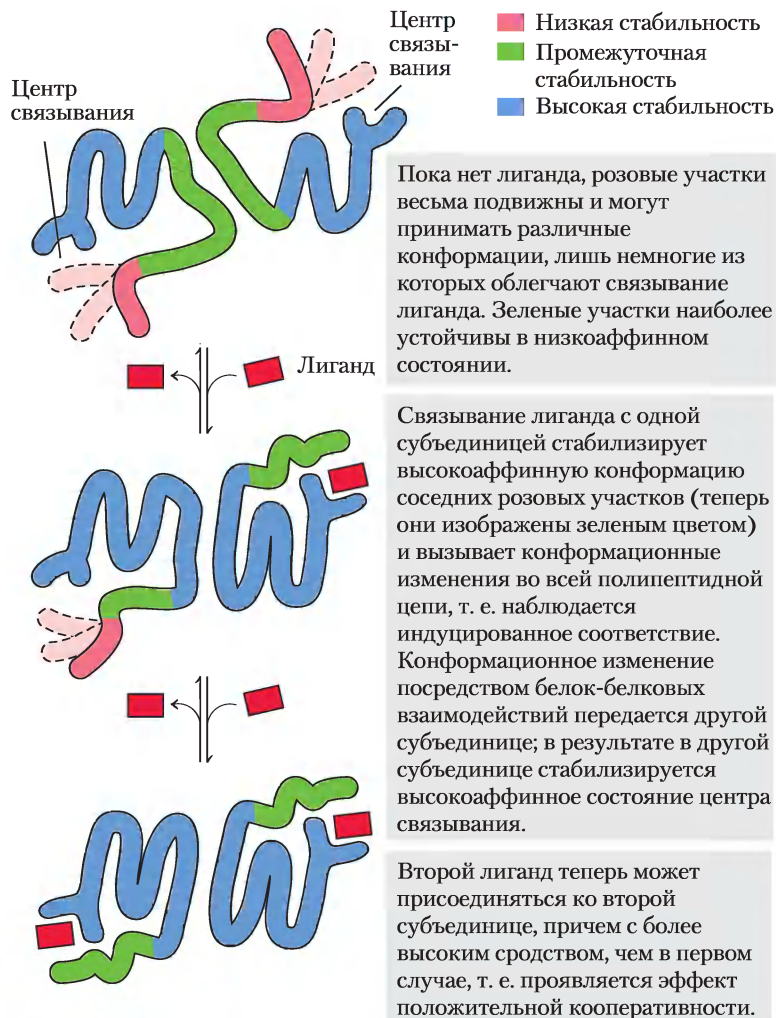


Рис. 5-13. Структурные перестройки в мультисубъединичном белке в процессе кооперативного связывания лиганда. Структурная стабильность белковой молекулы в разных участках может быть различной. На данной схеме представлен гипотетический димерный белок, имеющий участки высокой (синий цвет), промежуточной (зеленый цвет) и низкой стабильности (розовый цвет). Центр связывания лиганда построен из участков как с высокой, так и с низкой стабильностью, так что сродство белка к лиганду сравнительно небольшое. Конформационные изменения, происходящие при связывании лиганда, переводят белок из низкоаффинного в высокоаффинное состояние — вариант индуцированного соответствия.

с кислородом, является формой аллостерического взаимодействия, которое часто происходит в мультимерных белках. Связывание одного лиганда изменяет сродство остальных центров связывания, так что кислород в данном случае выступает и в качестве лиганда, и в качестве активирующего гомотропного модулятора. На каждой субъединице есть только один центр связывания O_2 , и аллостерические эффекты, приводящие к кооперативному связыванию, опосредованы

конформационными изменениями, передаваемыми от одной субъединицы к другой в результате их взаимодействий. Сигмовидная кривая связывания свидетельствует о кооперативности взаимодействия. Такой тип связывания гораздо более чувствителен к концентрации лиганда и используется во многих мультисубъединичных белках. Принципы аллостерического взаимодействия применимы также и к регуляторным ферментам, как мы увидим далее в гл. 6.

Кооперативные конформационные изменения зависят от различий в структурной стабильности отдельных частей белка, обсуждавшихся в гл. 4. Центр связывания аллостерического белка обычно построен из устойчивых фрагментов, поблизости от которых расположены сравнительно лабильные участки, способные часто менять свою конформацию или находящиеся в беспорядочном перемещении (рис. 5-13). При связывании лиганда подвижные части центра связывания стабилизируются в определенной конформации, что вызывает изменение конформации прилежащих участков полипептидной цепи. Если бы весь центр связывания имел жестко зафиксированную структуру, то при связывании лиганда лишь небольшие структурные изменения могли бы возникать в нем самом и распространяться на другие участки белка.

Подобно миоглобину, гемоглобин может связывать не только кислород, но и другие лиганды. Важным примером является связывание монооксида углерода (угарного газа), который связывается с гемоглобином примерно в 250 раз лучше, чем кислород. Вдыхание СО может вызвать очень тяжелые последствия для здоровья человека (доп. 5-1).

Кооперативное связывание лиганда можно описать количественно

Кооперативное связывание кислорода с гемоглобином впервые было проанализировано Арчибалдом Хиллом в 1910 г. Именно на этой работе основан общий подход к изучению кооперативного взаимодействия лигандов с мультисубъединичными белками.

Для белка, имеющего n центров связывания, уравнение 5-1 можно привести к виду



а выражение для константы ассоциации можно записать следующим образом:

$$K_a = \frac{[PL_n]}{[P][L]^n} \quad (5-13)$$

Аналогично уравнению 5-8 запишем выражение для θ :

$$\theta = \frac{[L]^n}{[L]^n + K_d} \quad (5-14)$$

Произведем перестановку и возьмем логарифм обеих частей уравнения:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} = \frac{[L]^n}{K_d} \quad (5-15)$$

$$\lg\left(\frac{\theta}{1 - \theta}\right) = n \lg [L] - \lg K_d \quad (5-16)$$

где $K_d = [L]^{n_{0,5}}$.

Выражение 5-16 называют **уравнением Хилла**, а график в координатах $\lg[\theta/(1 - \theta)]$ от $\lg[L]$ называют **графиком Хилла**. В соответствии с уравнением угол наклона графика Хилла должен быть равен n . Но угол наклона, определенный на основании экспериментальных данных, на самом деле отражает не число центров связывания, а степень взаимодействия между ними. Поэтому угол наклона графика Хилла, названный **коэффициентом Хилла** (n_H), является мерой кооперативности. Если коэффициент Хилла равен единице, связывание лиганда не кооперативное, что возможно даже в мультисубъединичном белке, если его субъединицы не взаимодействуют друг с другом. Значение $n_H > 1$ указывает на наличие положительной кооперативности при связывании лиганда. Именно такая ситуация наблюдается в случае гемоглобина, когда связывание одной молекулы лиганда способствует связыванию других молекул. Теоретический верхний предел значения n_H равен n . В подобном случае взаимодействие полностью кооперативное: все центры связывания на молекуле белка должны связывать лиганд одновременно и не должно существовать частично насыщенных лигандом молекул белка. На практике этот предел никогда не достигается; измеряемое значение n_H всегда меньше реального числа центров связывания лиганда в белке.

Значение $n_H < 1$ говорит об отрицательной кооперативности — связывание одной молекулы лиганда препятствует связыванию остальных. Детально описанных случаев отрицательной кооперативности известно мало.

Для того чтобы применить уравнение Хилла к связыванию кислорода с гемоглобином, следует заменить $[L]$ на pO_2 и K_d на P_{50}^n :

$$\lg\left(\frac{\theta}{1 - \theta}\right) = n \lg pO_2 - n \lg P_{50} \quad (5-17)$$



Озеро Пауэлл, Аризона, США, август 2000 г. Семья проводила каникулы на арендованной плавучей барже. Люди включили электрический генератор, поскольку пользовались кондиционером и смотрели телевизор. Примерно через четверть часа два брата в возрасте 8 и 11 лет спрыгнули в воду с кормовой палубы. Прямо под ней находилась выхлопная труба электрогенератора. Всего за две минуты оба мальчика настолько надыхались угарным газом, накопившимся в пространстве под палубой, что утонули. Этот случай, а также многие другие, произошедшие в 1990-е гг. на плавучих баржах подобной конструкции, привели к тому, что эти суда были отозваны для реконструкции выхлопной трубы электрогенераторов.

Монооксид углерода (СО, угарный газ) — газ без цвета и запаха; во всем мире ежегодно более половины умерших от отравления погибли от действия угарного газа. Сродство СО к гемоглобину примерно в 250 раз превышает сродство кислорода. В результате сравнительно невысокий уровень СО в воздухе может привести к трагическим последствиям. Комплекс, образующийся при связывании СО с гемоглобином, называют карбоксигемоглобином (СОНб).

Некоторое количество СО образуется в результате естественных процессов, однако локальное высокое содержание этого газа в воздухе, как правило, является результатом деятельности человека. Очень большой вклад в повышение уровня СО в атмосферном воздухе вносят выхлопные газы транспорта и газы производственных выбросов, поскольку СО образуется при неполном сгорании ископаемого топлива. Только в США ежегодно около 4000 человек становятся жертвой отравления СО (как случайно, так и преднамеренно). Многие несчастные случаи связаны с накоплением СО в замкнутом пространстве, например в домах при неаккуратном протапливании печи. Однако отравиться СО можно и на открытом воздухе, вдыхая выхлопы электрогенераторов, лодочных моторов, тракторов, различных транспортных средств или газонокосилок.

Концентрация СО в атмосфере редко достигает опасного уровня: обычно она колеблется от 0,05 ppm (частей на миллион) в отдаленных и малонаселенных районах до 3–4 ppm в некоторых городах северного полушария. По нормам, принятым в США, количество поглощенного человеком за восьмичасовой рабочий день СО не должно превышать 50 ppm. СОНб может накапливаться в организме человека, постоян-

но находящегося вблизи источника СО, пусть даже с низким уровнем содержания этого газа.

У здорового человека в среднем до 1% общего гемоглобина крови связано в комплекс СОНб. Поскольку СО содержится в табачном дыме, у многих курильщиков уровень связанного в виде СОНб гемоглобина составляет 3–8%, а у заядлых курильщиков может достигать 15%. У людей, которые на протяжении нескольких часов дышат воздухом с содержанием 570 ppm СО, уровень СОНб достигает 50% общего гемоглобина. Были разработаны точные методы, позволяющие определять уровень СОНб в крови на основании содержания СО в атмосфере (рис. 1). На плавучих баржах, имеющих электрогенератор с такой же выхлопной трубой, как в описанной выше трагедии, уровень СО под кормовой палубой достигал 6–30 тыс. ppm, а уровень кислорода там снижен с 21 до 12%. Даже на кормовой палубе концентрация СО составляла около 7200 ppm; этого вполне достаточно, чтобы вызвать смерть за считанные минуты.

Как влияет СОНб на состояние человека? Если в комплекс связано менее 10% всего гемоглобина, то симптомов отравления практически не наблюдается. При уровне 15% у некоторых людей начинаются головные боли, а при 20–30% эти боли становятся очень сильными и обычно сопровождаются тошнотой, головокружением, нарушением ориентации и зрения. Симптомы

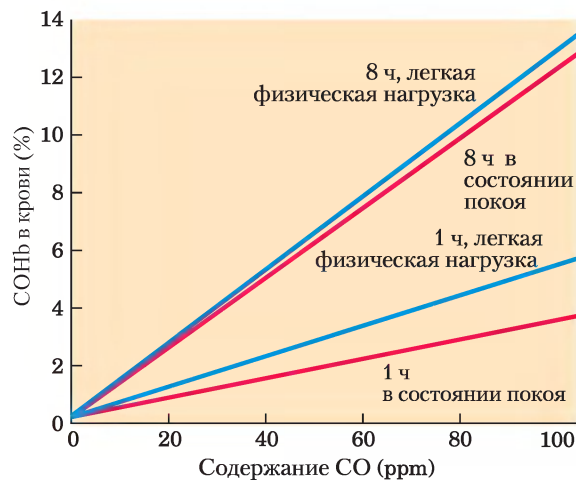


Рис. 1. Соотношение между уровнем СОНб в крови и концентрацией СО в воздухе. Эксперименты проводили в разных условиях, причем сравнивали результаты краткого и длительного воздействия СО, а также воздействие СО на человека в состоянии покоя и при физической нагрузке.

обычно исчезают, если пациенту дают дышать кислородом. При уровне СОНб от 30 до 50% неврологические проявления становятся более тяжелыми, а при 50% СОНб человек теряет сознание и может впасть в кому; возможна остановка дыхания. Если человек подвергался воздействию СО длительное время, то некоторые нарушения могут стать необратимыми. Смерть обычно наступает при уровне СОНб выше 60%. Вскрытие тел мальчиков, погибших на озере Пауэлл, показало, что уровень СОНб у них составлял 59 и 52%.

На связывание СО с гемоглобином оказывают влияние несколько факторов, в том числе физическая нагрузка (рис. 1) и изменение давления воздуха на разной высоте над уровнем моря. Из-за высокого базового уровня СОНб в крови курильщики часто ощущают симптомы от воздействия СО быстрее, чем некурящие. Люди с заболеваниями сердца, легких и крови, при которых снижается доступ кислорода к тканям, также могут ощущать симптомы отравления при более низком уровне СО, чем здоровые люди. Особенно высокому риску при повышении уровня СО подвергается плод в утробе матери, поскольку гемоглобин плода имеет еще более высокое сродство к СО, чем гемоглобин взрослого. Известны случаи отравления угарным газом беременных женщин, когда плод погибал, а мать оставалась жива.

Может показаться странным, что связывание половины гемоглобина в комплексе СОНб приводит к гибели, в то время как люди с тяжелой анемией, при которой уровень Нб снижен вдвое, живут практически нормально. Дело заключается в том, что связывание СО не только уменьшает содержание в крови гемоглобина, способного переносить кислород, но и воздействует на сродство к кислороду свободных субъединиц гемоглобина. При связывании СО с одной или двумя субъединицами тетрамера гемоглобина сродство к O_2 у остальных субъединиц повышается (рис. 2). Такой гемоглобин может эффективно связывать кислород в легких, но очень неохотно высвобождает его в тканях. Недостаток кислорода в тканях быстро приводит к тяжелым последствиям. Кроме того, воздействие не ограничивается только связыванием гемоглобина; СО взаимодействует с другими гемовыми белками и многими металлопротеинами. Все детали этих взаимодействий еще не выяснены, однако считается, что именно здесь кроется причина некоторых долгосрочных проявлений острого, но не смертельного отравления СО.

При подозрении на отравление угарным газом необходимо как можно быстрее удалить пострадавшего от источника СО, однако это не всегда приводит к быстрой нормализации состояния. При перемещении пострадавшего в нормальную атмосферу кислород начинает вытеснять СО из комплекса с гемоглобином. Но содержание СОНб снижается довольно медленно; время полувыведения СО составляет от 2 до 6,5 ч в зависимости от индивида и факторов окружающей среды. Если пациенту через маску вводят чистый кислород, то скорость выведения СО увеличивается приблизительно в четыре раза. Если подавать чистый кислород под давлением 3 атм (303 кПа), то время замещения СО на O_2 сокращается до десятков минут. Таким образом, при отравлении СО необходима быстрая и специализированная медицинская помощь.

В предотвращении отравлений могут быть полезны домашние детекторы СО. Это простой и недорогой способ защиты от возможной трагедии. Изучая материалы для данного дополнения, мы сами незамедлительно приобрели несколько новых детекторов СО для своих квартир.

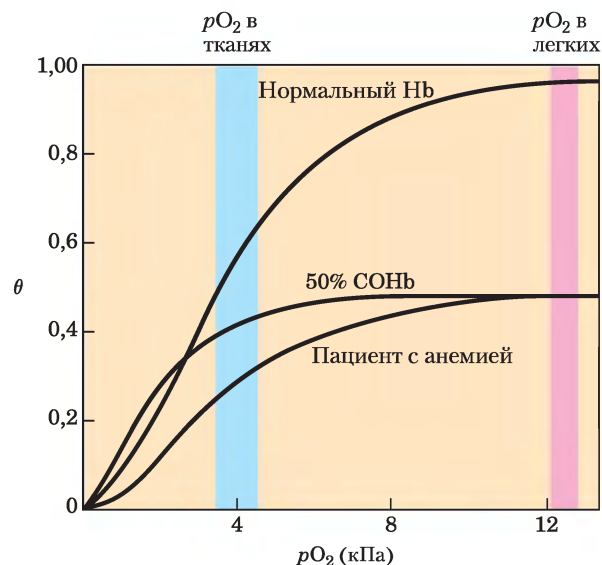


Рис. 2. Кривые связывания кислорода для нормального гемоглобина, гемоглобина пациента с анемией, у которого функционирует лишь 50% гемоглобина, а также гемоглобина пациента, у которого 50% субъединиц гемоглобина уже связаны в комплекс с СО. Указан диапазон значений pO_2 в легких и тканях человека.

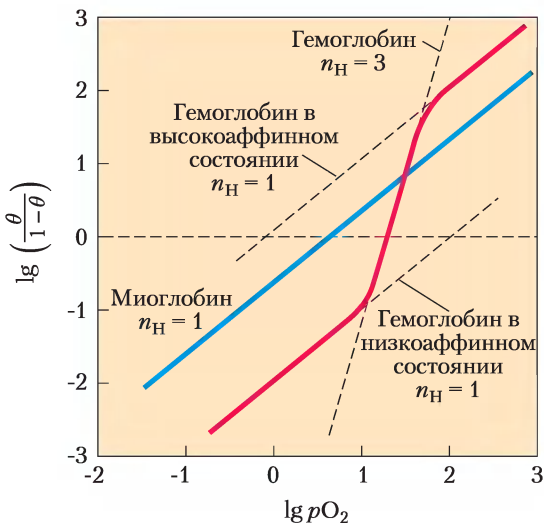


Рис. 5-14. Графики Хилла для связывания кислорода с миоглобином и гемоглобином. При $n_H = 1$ кооперативность не наблюдается. В случае гемоглобина максимальная степень кооперативности $n_H = 3$. Хотя это значение указывает на высокую степень кооперативности, оно все же ниже числа центров связывания кислорода в молекуле гемоглобина. Это обычная ситуация для белков с аллостерическим механизмом действия.

Графики Хилла для миоглобина и гемоглобина представлены на [рис. 5-14](#).

Две модели кооперативного связывания

Биохимикам уже многое известно относительно Т- и R-состояний гемоглобина, однако механизм перехода $T \rightarrow R$ ясен не до конца. Большой вклад в решение этой проблемы внесли две модели, описывающие кооперативное связывание лигандов с белками, имеющими несколько центров связывания.

Первая модель была предложена Жаком Моно, Джеффри Уайменом и Жаном-Пьером Шанже в 1965 г. и называется **моделью Моно–Уаймена–Шанже** или **симметричной моделью** ([рис. 5-15, а](#)). В данной модели предполагается, что субъединицы белка, участвующего в кооперативном взаимодействии с лигандом, функционально идентичны, что каждая субъединица может существовать, по крайней мере, в двух конформациях и что все субъединицы одновременно переходят из одной конформации в другую. В рамках данной модели не допускается, что белок может иметь субъедини-

цы, находящиеся в разных конформациях. Две конформации находятся между собой в равновесии. Лиганд способен связываться с любой конформацией, но с разным сродством. Последовательное связывание молекул лиганда с белком в низкоаффинной конформации (которая наиболее устойчива в случае отсутствия лиганда) повышает вероятность перехода в высокоаффинное состояние.

В соответствии со второй моделью, названной **последовательной моделью** и предложенной Даниэлем Кошландом с коллегами в 1966 г., связывание лиганда может индуцировать конформационные изменения в отдельной субъединице. Конформационные изменения в этой субъединице приводят к аналогичным изменениям в соседней, что повышает вероятность связывания второй молекулы лиганда. Данная модель допускает существование большего числа промежуточных состояний, чем симметричная модель. Две описанные модели не являются взаимоисключающими. Симметричная модель (которую иногда называют моделью «все или ничего») может рассматриваться как частный случай последовательной модели. В гл. 6 мы будем пользоваться этими моделями для описания поведения аллостерических ферментов.

Гемоглобин переносит H^+ и CO_2

Гемоглобин не только переносит от легких к тканям практически весь кислород, необходимый клеткам, но он также переносит образующиеся при дыхании клеток H^+ и CO_2 от тканей в легкие и почки, где они выводятся из организма. Газообразный CO_2 , образующийся при окислении органических молекул в митохондриях, вступает в реакцию с водой и образует бикарбонат:



Данную реакцию катализирует **карбоангидраза**, которой особенно много в эритроцитах. Диоксид углерода не очень хорошо растворяется в воде, и, если бы он не превращался в бикарбонат, в крови и тканях оказались бы пузырьки CO_2 . Как видно из уравнения реакции, гидратация CO_2 с образованием бикарбонат-ионов приводит к повышению концентрации H^+ (снижению pH) в тканях. Связывание кислорода с гемоглобином очень сильно зависит от pH и концентрации CO_2 , так

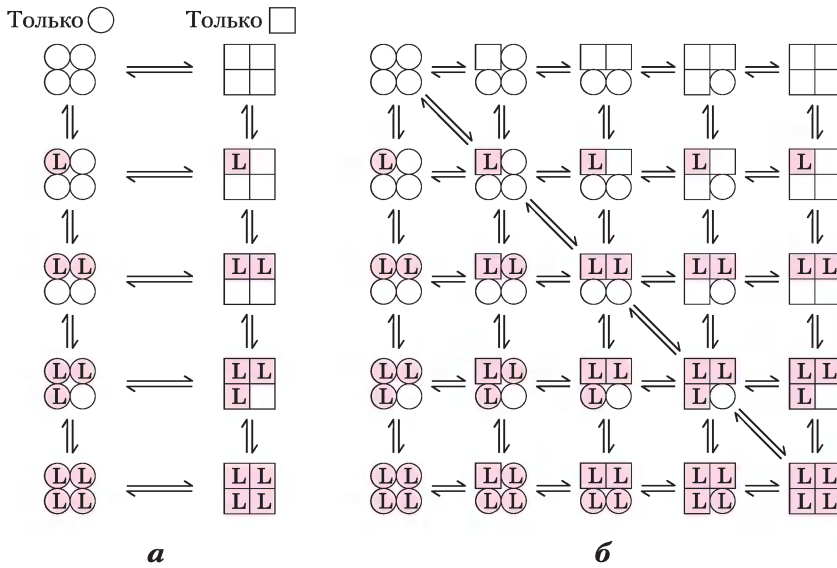


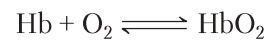
Рис. 5-15. Две основные модели, объясняющие взаимные превращения активной и неактивной форм белков при кооперативном связывании лигандов. В принципе, эти модели применимы к любым белкам (в том числе и ферментам, см. гл. 6), способным к кооперативному связыванию лигандов; в данном случае изображены белки, состоящие из четырех субъединиц, поскольку изначально модели были предложены для гемоглобина. *а)* В симметричной модели (иначе называемой моделью «все или ничего» или моделью Моно–Уаймена–Шанже) предполагается, что все субъединицы одновременно находятся в одинаковой конформации — либо неактивной и с низким сродством (○), либо в активной с высоким сродством к лиганду (□). В зависимости от константы равновесия между этими формами (K_1) связывание одной или большего числа молекул лиганда (L) будет сдвигать равновесие в сторону активной формы. Субъединицы, связавшие лиганд, выделены цветом. *б)* В последовательной модели (модели индуцированного соответствия) каждая субъединица независимо от остальных может находиться либо в активной, либо в неактивной форме. В результате возможно существование большого числа конформационных состояний белка.

что взаимные превращения CO_2 и бикарбоната играют важнейшую роль в регуляции связывания и высвобождения кислорода в крови.

Гемоглобин переносит около 40% H^+ и 15–20% CO_2 , образующихся в тканях, к легким и почкам (остаток H^+ поглощается бикарбонатным буфером плазмы крови, а остаток CO_2 переносится в виде растворенных HCO_3^- и CO_2). Связывание H^+ и CO_2 обратно пропорционально связыванию кислорода. При относительно низком значении pH и высокой концентрации CO_2 в периферических тканях сродство гемоглобина к кислороду снижается по мере связывания H^+ и CO_2 , и кислород высвобождается. И наоборот, в капиллярах легких по мере выделения CO_2 и повышения pH крови сродство гемоглобина к кислороду возрастает, и белок может связывать

большее количество O_2 для доставки к периферическим тканям. Это влияние pH и концентрации CO_2 на связывание и высвобождение кислорода гемоглобином называют **эффектом Бора** (по имени датского физиолога Кристиана Бора — отца физика Нильса Бора, открывшего этот эффект в 1904 г.).

Равновесная реакция связывания гемоглобина с одной молекулой кислорода выглядит следующим образом:



Однако это уравнение неполное. Чтобы учесть влияние концентрации H^+ , перепишем его в следующем виде:

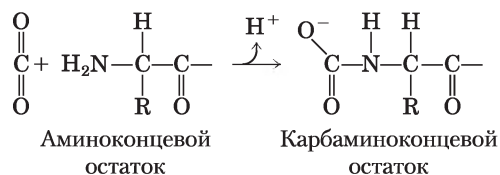


где Hb^+ — это протонированная форма гемоглобина. Из данного уравнения следует, что кривая насыщения гемоглобина кислородом зависит от концентрации H^+ (рис. 5-16). Гемоглобин связывает как O_2 , так и H^+ , но с обратным сродством: при высокой концентрации кислорода (в легких) гемоглобин связывает кислород и высвобождает протон, а при низкой концентрации кислорода (в периферических тканях) гемоглобин связывает протон и высвобождает O_2 .

Кислород и H^+ связываются в разных участках молекулы гемоглобина. Кислород связывается с атомом железа в геме, а H^+ — с одним из нескольких аминокислотных остатков белка. Основной вклад в эффект Бора вносит His^{146} (His HC3) β -субъединицы. В протонированном состоянии этот остаток образует ионную пару с Asp^{94} (Asp FG1), что способствует стабилизации дезоксигемоглобина в состоянии Т (рис. 5-9). Образование ионной пары стабилизирует протонированную форму His HC3 , что отражается на аномально высоком значении pK_a этой группы в состоянии Т. При переходе в состояние R pK_a этого остатка гистидина возвращается к нормальному значению 6,0, поскольку ионная

пара распадается; в оксигемоглобине при pH 7,6 (нормальное значение pH крови в легких) этот остаток в основном находится в депротонированной форме. По мере повышения концентрации H^+ происходит протонирование His HC3 , способствующее высвобождению кислорода и переходу в состояние Т. Аналогичный эффект оказывает протонирование N-концевых остатков α -субъединиц некоторых других остатков His и, возможно, других групп.

Таким образом, четыре полипептидные цепи гемоглобина взаимодействуют друг с другом не только при связывании кислорода в гемовых группах, но и при связывании протона со специфическими аминокислотными остатками. И это еще не все. Гемоглобин связывает также CO_2 , причем опять-таки этот процесс находится в обратной зависимости от связывания кислорода. Углекислый газ связывается с концевой α -аминогруппой каждой из четырех глобиновых цепей, в результате чего образуется карбаминогемоглобин:



В результате данной реакции выделяется H^+ , который вносит свой вклад в эффект Бора. Карбаматные группы также участвуют в образовании солевых мостиков (не показаны на рис. 5-9), что способствует стабилизации состояния Т и высвобождению кислорода.

При высокой концентрации углекислого газа (в периферических тканях) часть CO_2 связывается с гемоглобином, и сродство гемоглобина к кислороду снижается, что приводит к высвобождению O_2 . И наоборот, при связывании гемоглобина с кислородом в легких происходит высвобождение CO_2 . Именно благодаря способности молекулы гемоглобина передавать информацию о связывании лиганда от одной субъединицы к другой этот белок оказывается великолепно приспособленным для переноса эритроцитами O_2 , CO_2 и H^+ .

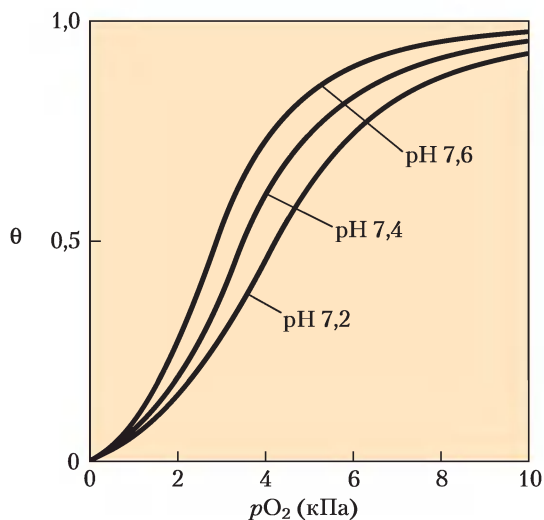
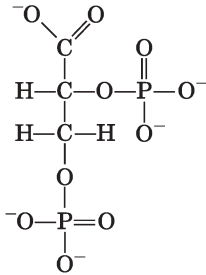


Рис. 5-16. Влияние pH на связывание кислорода с гемоглобином. Значение pH крови в легких составляет 7,6, а в тканях — 7,2. Эксперименты по связыванию кислорода с гемоглобином часто проводят при pH 7,4.

Связывание кислорода с гемоглобином регулируется 2,3-бисфосфоглицератом

Взаимодействие 2,3-бисфосфоглицерата (БФГ) с гемоглобином является примером гетеротропной аллостерической регуляции.



2,3-Бисфосфоглицерат (БФГ)

БФГ в довольно высокой концентрации содержится в эритроцитах. Выделяемый гемоглобин обычно содержит связанный БФГ, который бывает трудно удалить полностью. На самом деле, кривые связывания O_2 с гемоглобином, которые мы рассматривали до сих пор, были получены в присутствии связанного БФГ. Известно, что БФГ значительно снижает сродство гемоглобина к кислороду; существует обратная зависимость между связыванием БФГ и связыванием O_2 . Следовательно, можно записать уравнение еще одной реакции связывания гемоглобина с лигандом:



БФГ связывается с молекулой гемоглобина на некотором расстоянии от центра связывания кислорода и регулирует сродство гемоглобина к O_2 в зависимости от парциального давления кислорода в легких. БФГ играет важную физиологическую роль при адаптации человека к пониженному уровню $p\text{O}_2$ на больших высотах. У здорового человека, прошедшего какое-то время на берегу океана, связывание кислорода с гемоглобином отрегулировано таким образом, что доставляемое к тканям количество O_2 соответствует ~40% максимального количества, которое способна переносить кровь (рис. 5-17). Представьте себе, что этот человек в короткий срок попадает в горы на высоту 4500 метров над уровнем моря, где $p\text{O}_2$ сравнительно низкое. Доставка кислорода к тканям в такой ситуации снижается. Однако спустя всего несколько часов концентрация БФГ в крови начинает повышаться, что при-

водит к снижению сродства гемоглобина к кислороду. Коррекция уровня БФГ в крови оказывает небольшой эффект на связывание O_2 в легких, но весьма значительный — на его высвобождение в тканях. В результате доставка кислорода к тканям восстанавливается на нормальном уровне — около 40% максимально возможного количества переносимого кровью кислорода. При возвращении человека с гор наблюдается обратная ситуация. Кроме того, концентрация БФГ в эритроцитах повышена у людей, страдающих от гипоксии; это

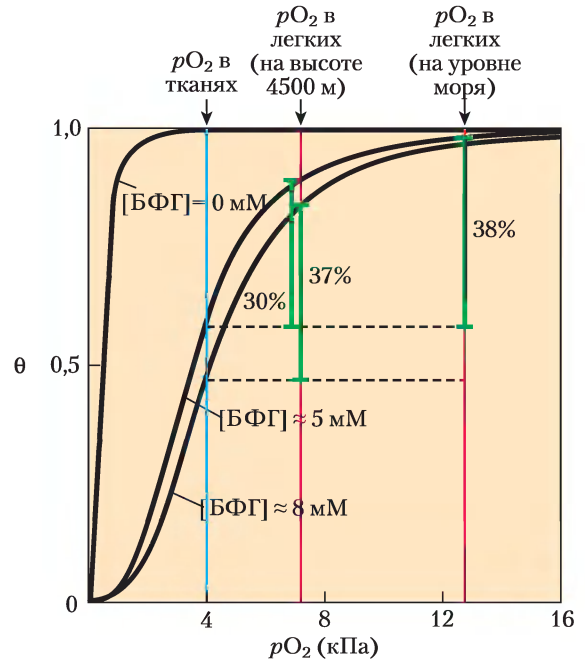


Рис. 5-17. Влияние БФГ на связывание кислорода с гемоглобином. В норме концентрация БФГ в крови человека составляет 5 мМ на уровне моря и 8 мМ на больших высотах. Заметьте, что гемоглобин лучше связывает кислород при полном отсутствии БФГ; кривая связывания при этом имеет вид гиперболы. В действительности измеряемый коэффициент Хилла для кооперативного связывания O_2 при удалении БФГ снижается слабо (от 3 до 2,5), но ход кривых в присутствии БФГ и без него значительно различается. У человека, находящегося на уровне моря, гемоглобин в легких почти насыщен кислородом, а в тканях насыщен примерно на 60%, так что количество оставляемого в тканях кислорода соответствует 40% максимального количества, которое может переносить кровь. На больших высотах доставка кислорода к тканям снижается примерно на четверть и составляет 30% максимума. Однако повышение концентрации БФГ снижает сродство гемоглобина к кислороду, так что в тканях вновь остается около 40% переносимого кровью кислорода.

патологическое состояние возникает вследствие недостаточного снабжения периферических тканей кислородом из-за нарушения работы легких или системы кровообращения.

Центр связывания БФГ расположен в полости между β -субъединицами гемоглобина в состоянии Т (рис. 5-18). Эта полость выстлана положительно заряженными группами аминокислотных остатков, которые могут взаимодействовать с отрицательно заряженными группами БФГ. Каждый тетрамер гемоглобина может связывать лишь одну молекулу БФГ. При связывании с гемоглобином БФГ стабилизирует состояние Т и тем самым снижает сродство гемоглобина к кислороду. Переход в состояние R сужает полость, в которой связывается БФГ, и мешает связыванию. В отсутствие БФГ гемоглобин легче переходит в состояние R.

БФГ играет важную роль в регуляции связывания кислорода с гемоглобином в период развития плода. Плод должен экстрагировать кислород из крови матери, поэтому гемоглобин плода должен иметь более высокое сродство к кислороду, чем гемоглобин матери. Гемоглобин плода содержит не β -, а γ -субъединицы, и представляет собой тетрамер $\alpha_2\gamma_2$. Этот тетрамер гораздо слабее связывает БФГ, чем гемоглобин взрослого, и, следовательно, имеет более высокое сродство к кислороду. **Кислородсвязывающие белки — аллостерическая регуляция гемоглобина**

Серповидноклеточная анемия — «молекулярная болезнь» гемоглобина

Определяющую роль аминокислотной последовательности для формирования вторичной, третичной и четвертичной структур глобулярного белка можно продемонстрировать на примере серповидноклеточной анемии — наследственного заболевания человека. В человеческой популяции существует около 500 вариантов гемоглобина, большинство из которых встречаются довольно редко. Многие варианты различаются лишь одной аминокислотой. Обычно такие замены почти не влияют на структуру и функции гемоглобина, однако некоторые приводят к серьезным последствиям. Каждый вариант молекулы гемоглобина является продуктом измененного гена. Такие вариантные формы генов называют аллелями. Поскольку обычно существует две копии каждого гена, каждый конкретный человек может иметь две копии одного аллеля (быть гомозиготным по данному гену) или по одной копии двух различных аллелей (быть гетерозиготным по данному гену).

Серповидноклеточная анемия проявляется, когда человек унаследовал аллель аномального гемоглобина от обоих родителей. В крови таких больных гораздо меньше эритроцитов, и они имеют неправильную форму. Обращает на себя внимание

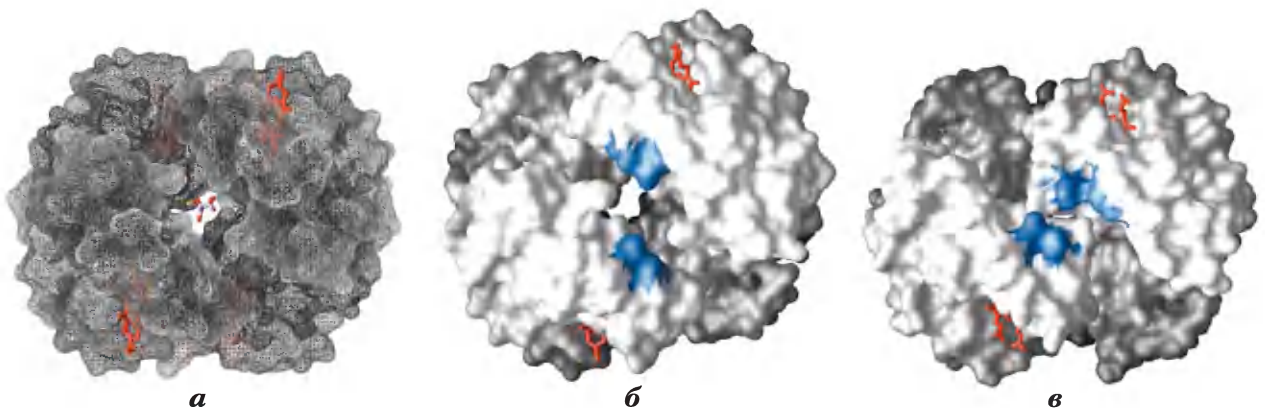


Рис. 5-18. Связывание БФГ с дезоксигемоглобином. а) Связывание БФГ стабилизирует состояние Т дезоксигемоглобина, поверхность которого изображена здесь в виде сетки (PDB ID 1HGA). б) Отрицательно заряженные группы БФГ взаимодействуют с положительно заряженными группами (на данном изображении поверхности выделены синим цветом), окружающими полость между β -субъединицами в состоянии Т. в) При присоединении кислорода к гемоглобину и переходе в состояние R (PDB ID 1BBV) полость для связывания БФГ исчезает (сравните б и в с рис. 5-10).

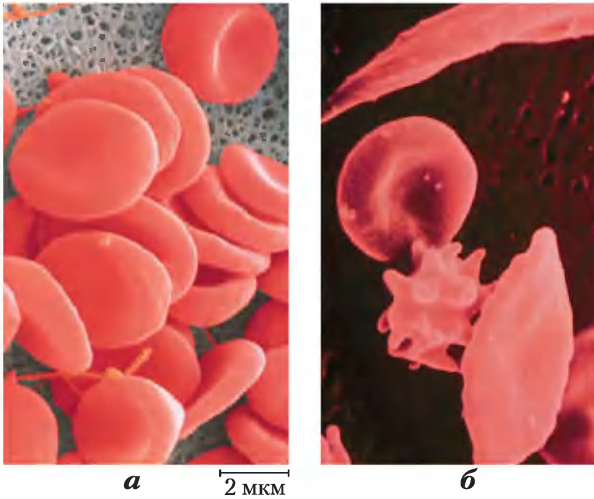


Рис. 5-19. а) Нормальные эритроциты, имеющие двояковогнутую форму. б) Эритроциты различной формы, в том числе шиповидные и серповидные, в крови больных серповидноклеточной анемией.

не только большое количество незрелых клеток, но и наличие длинных, тонких эритроцитов, имеющих форму полумесяца или серпа (**рис. 5-19**). При дезоксигенации гемоглобин из серповидных клеток — гемоглобин S — становится нерастворимым и образует пучки трубчатых волокон (**рис. 5-20**), а нормальный гемоглобин (гемоглобин А) при дезоксигенации остается растворимым. Именно нерастворимые волокна дезоксигемоглобина S определяют неправильную форму эритроцитов, причем число серповидных эритроцитов в крови возрастает при высвобождении кислорода.

Аномальные свойства гемоглобина S объясняются заменой всего одной аминокислоты — остаток Glu в положении 6 в двух β -цепях замещается остатком Val. В остатке валина R-группа не несет электрического заряда, тогда как глутаминовая кислота при pH 7,4 имеет отрицательный заряд. В результате у гемоглобина S на две отрицательно заряженные группы меньше, чем у нормального гемоглобина А — по одной в каждой β -цепи. Замена остатка Glu на Val приводит к образованию «липкого» гидрофобного контакта в шестом положении β -цепи на внешней поверхности молекулы. В итоге молекулы дезоксигемоглобина S слипаются и образуют аномально длинные нитевидные агрегаты, характерные для данного заболевания.

Кислородсвязывающие белки — дефект Hb приводит к серьезным генетическим заболеваниям

Как уже было сказано, серповидноклеточная анемия проявляется у людей, гомозиготных по аномальному аллелю, кодирующему β -субъединицы гемоглобина. У гетерозиготных людей, получивших аномальный аллель только

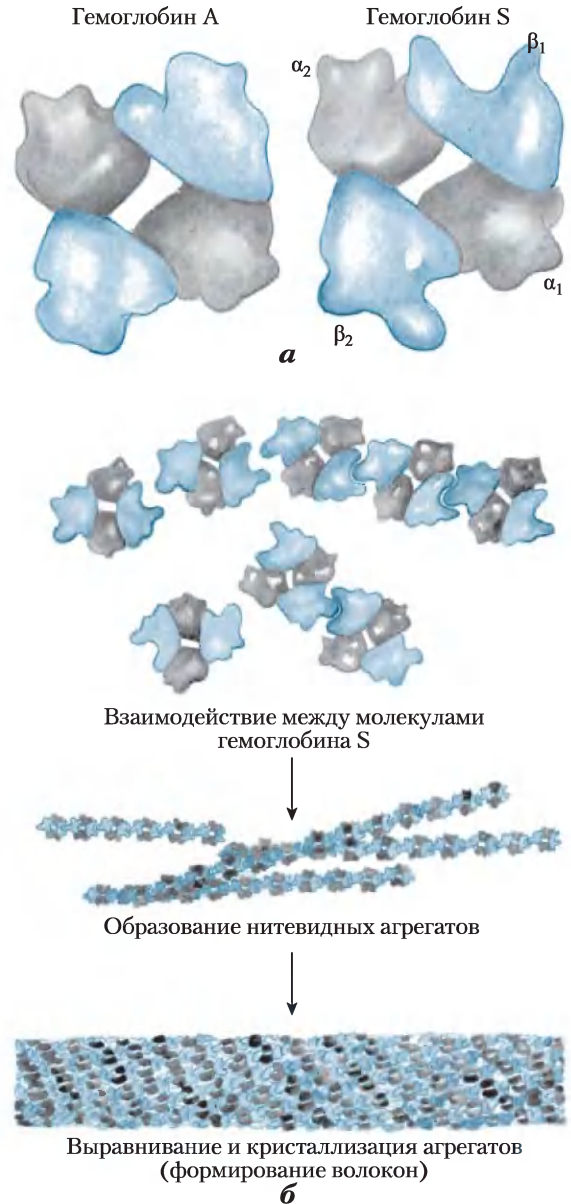


Рис. 5-20. Нормальный и серповидный гемоглобин. а) Различие между конформацией гемоглобина А и гемоглобина S вызвано заменой единственной аминокислоты в двух β -цепях. б) В результате данной замены гемоглобин S имеет на поверхности небольшой гидрофобный участок, способствующий слипанию молекул и образованию нерастворимых нитевидных волокон.

от одного родителя, проявляется менее тяжелое состояние, называемое серповидноклеточным признаком. При данном состоянии менее 1% эритроцитов при дезоксигенации приобретают серповидную форму. Такие люди живут практически нормальной жизнью, просто им следует избегать слишком больших физических нагрузок и других воздействий на систему кровообращения.

Серповидноклеточная анемия является тяжелым и опасным для жизни заболеванием. Больные с трудом выполняют физическую работу. Они быстро устают, испытывают головокружения и задыхаются, кроме того, у них наблюдаются шумы в сердце и учащается пульс. Содержание гемоглобина в крови таких людей составляет половину от нормы (нормальный уровень гемоглобина 15–16 г/100 мл), поскольку серповидные клетки очень хрупкие и легко повреждаются, это приводит к анемии («малокровию»). Еще более серьезное осложнение — закупорка капилляров крупными клетками аномальной формы, что сопровождается болями и нарушает нормальную работу органов. Именно это и является основной причиной ранней смерти многих людей, страдающих данным заболеванием.

Без медицинского вмешательства больные серповидноклеточной анемией умирают в детском возрасте. Это заболевание на удивление часто встречается в некоторых странах Африки. Исследования, посвященные распространенности аллеля серповидного гемоглобина, показали, что его наличие в некоторой степени защищает гетерозигот от летальной формы малярии. Естественный отбор способствовал установлению такого баланса между опасностью гомозиготного состояния и устойчивостью к малярии при гетерозиготном состоянии. ■

Краткое содержание раздела 5.1

ОБРАТИМОЕ СВЯЗЫВАНИЕ БЕЛКОВ

С ЛИГАНДАМИ: БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ КИСЛОРОД

■ В организме белки часто взаимодействуют с другими молекулами. Молекула, которая связывается с белком, называется лигандом, а участок белка, где происходит связывание,

называется центром связывания. При связывании лиганда белки могут подвергаться конформационным изменениям, в результате чего возникает так называемое индуцированное соответствие. В мультисубъединичных белках связывание лиганда с одной субъединицей может влиять на связывание с другой субъединицей. Связывание лиганда может регулироваться.

■ Миоглобин содержит гемовую простетическую группу, связывающую кислород. Гем состоит из единственного атома железа в форме Fe^{2+} в комплексе с порфирином. Миоглобин связывает кислород обратимым образом; это связывание можно описать с помощью константы ассоциации K_a или константы диссоциации K_d . В мономерных белках, каким является миоглобин, зависимость доли занятых центров связывания от концентрации лиганда описывается гиперболической функцией.

■ Нормальный гемоглобин взрослого человека состоит из четырех гемсодержащих субъединиц: двух α - и двух β -субъединиц; существует большое структурное сходство между всеми субъединицами гемоглобина и молекулой миоглобина. Гемоглобин может существовать в двух состояниях: T и R. Пока не произошло связывание кислорода, состояние T более устойчиво. Связывание кислорода способствует переходу гемоглобина в состояние R.

■ Связывание кислорода с гемоглобином — кооперативный аллостерический процесс. При связывании O_2 в одном центре происходят конформационные изменения, влияющие на другие центры связывания (аллостерический эффект). Конформационные переходы между состояниями T и R, опосредованные взаимодействием субъединиц, способствуют кооперативному связыванию. В результате связывание кислорода с гемоглобином описывается S-образной кривой и может быть проанализировано с помощью графика Хилла.

■ Для описания кооперативного связывания лигандов с мультисубъединичными белками

предложено две модели: симметричная и последовательная.

- Гемоглобин связывает не только кислород, но еще H^+ и CO_2 , что приводит к образованию ионных пар, стабилизирующих состояние Т, и снижению сродства гемоглобина к кислороду (эффект Бора). Кроме того, связывание кислорода модулируется 2,3-бисфосфоглицератом (БФГ), который взаимодействует с гемоглобином в состоянии Т и стабилизирует это состояние.
- Серповидноклеточная анемия — наследственное заболевание, вызванное одной аминокислотной заменой (Glu^6 на Val^6) в обеих β -цепях гемоглобина. Такая замена приводит к образованию гидрофобного участка на поверхности гемоглобина и способствует слипанию молекул в пучки волокон. У гомозиготных по этому дефекту людей проявляется серьезное заболевание.

5.2. Комплементарное взаимодействие между белками и лигандами: иммунная система и иммуноглобулины

Мы уже показали, как конформация белков зависит от связывания небольших лигандов (O_2 и CO_2) с гемом и сама влияет на это связывание. Однако большинство взаимодействий белков с лигандами происходит без участия протетических групп. Центр связывания лиганда чаще всего напоминает центр связывания БФГ на молекуле гемоглобина — это просто полость в молекуле белка, в которой расположены определенные аминокислотные остатки, обеспечивающие специфичность связывания. Общим свойством центров связывания является эффективное распознавание даже очень близких по структуре лигандов.

У всех позвоночных есть иммунная система, способная различать «свои» и «чужие» молекулы, а затем уничтожить те, что воспринимаются как «чужие». Так иммунная система борется с вирусами, бактериями и другими патогенами и молекулами, способными нанести вред организму. На физиологическом уровне реакция

иммунной системы на чужеродную частицу или организм представляет собой сложный и координированный процесс взаимодействий между разными классами белковых и других молекул и различных типов клеток. А на уровне отдельных белков иммунный ответ служит примером того, как на основе обратимого связывания лигандов и белков строится очень чувствительная и специфическая биохимическая система.

Иммунный ответ определяется действием ряда специализированных клеток и белков

Иммунный ответ формируется разными типами **лейкоцитов** (белых клеток крови), в том числе **макрофагами** и **лимфоцитами**, которые происходят из недифференцированных стволовых клеток костного мозга. Лейкоциты могут выходить из кровотока и патрулировать ткани, причем каждая клетка способна синтезировать один или несколько белков, распознающих и связывающих чужеродные молекулы.

Иммунитет складывается из действия двух взаимодополняющих систем — гуморальной и клеточной. **Гуморальный иммунитет** (от лат. *humor* — жидкий) направлен против бактериальных инфекций и внеклеточных вирусов (тех, что попадают в жидкости организма), но может также реагировать на введение в организм и отдельных белков. **Клеточный иммунитет** разрушает хозяйские клетки, пораженные вирусом, а также уничтожает некоторых паразитов и чужеродные ткани.

Главным элементом гуморального иммунитета являются растворимые белки, называемые **антителами** или **иммуноглобулинами (Ig)**. Иммуноглобулины связываются с бактериями, вирусами и крупными чужеродными молекулами, которые должны быть уничтожены. Иммуноглобулины, составляющие до 20% белков крови, образуются в **В-клетках (В-лимфоцитах)**, называемых так потому, что они окончательно созревают в костном мозге (англ. *bone marrow*).

Главным элементом клеточного иммунитета являются определенные **Т-клетки (Т-лимфоциты)**, чье название происходит от тимуса, где они заканчивают свое созревание), а именно **цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ)**, или клетки-киллеры.

В распознавании инфицированных клеток или паразитов принимают участие белки, находящиеся на поверхности цитотоксических клеток — **Т-клеточные рецепторы**. Рецепторы — это белки, обычно расположенные на внешней поверхности клетки и выходящие за пределы плазматической мембраны. Рецепторы узнают и связывают внеклеточные лиганды, вызывая при этом определенные процессы в клетке.

Кроме цитотоксических Т-клеток существуют Т-клетки-помощники, или Т-хелперы (T_H). Их функция состоит в образовании растворимых сигнальных белков цитокинов, к которым, в частности, относятся интерлейкины. Т-хелперы взаимодействуют с макрофагами. T_H лишь косвенным образом участвуют в уничтожении инфицированных клеток и патогенных организмов, избирательно стимулируя те цитотоксические Т-клетки и В-клетки, которые связывают конкретный антиген. В результате данного процесса, называемого клональной селекцией, возрастает количество иммунных клеток, которые могут реагировать на появление этого антигена. Роль T_H особенно ярко проявляется в случае вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вызывающего синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД). Первой мишенью ВИЧ как раз являются T_H . Уничтожение этих клеток постепенно разрушает всю иммунную систему. Функции различных типов лейкоцитов отражены в табл. 5-2.

Таблица 5-2 Некоторые типы лейкоцитов иммунной системы

Тип клеток	Функции
Макрофаги	Поглощают крупные частицы и клетки путем фагоцитоза
В-лимфоциты (В-клетки)	Синтезируют и секретируют антитела
Т-лимфоциты (Т-клетки) Цитотоксические Т-клетки (ЦТЛ, клетки-киллеры)	Взаимодействуют с инфицированными клетками хозяина посредством Т-клеточных рецепторов
Т-хелперы (T_H)	Взаимодействуют с макрофагами и секретируют цитокины (интерлейкины), стимулирующие пролиферацию ЦТЛ, T_H и В-клеток

Каждый белок иммунной системы, будь то антитело, образованное В-клеткой, или рецептор Т-клетки, специфическим образом связывает молекулы с определенной химической структурой, отличая их от всех остальных молекул. В организме человека может вырабатываться более 10^8 различных антител, каждое из которых отличается определенной специфичностью. Такое необычайное разнообразие делает возможным узнавание и связывание практически любой химической структуры на поверхности вирусов или чужеродных клеток. Огромное разнообразие антител является результатом сборки генов иммуноглобулинов из отдельных фрагментов по механизму генетической рекомбинации (гл. 25, рис. 25-26).

Некоторые особенности взаимодействия антител или Т-клеточных рецепторов с узнаваемыми ими молекулами являются специфическими для иммунной системы, и для их описания используется специальная терминология. Любые молекулы или патогены, способные вызвать иммунный ответ, называются **антигенами**. Антигеном может быть вирус, клеточная стенка бактерии, отдельный белок или другая макромолекула. Сложный антиген может связываться с несколькими различными антителами. Каждое антитело и каждый Т-клеточный рецептор связываются лишь с одной конкретной молекулярной структурой антигена, называемой **антигенной детерминантой**, или **эпитопом**.

Иммунная система не реагирует на небольшие молекулы, которые являются обычно промежуточными или конечными продуктами клеточного метаболизма. Молекулы с молекулярной массой менее 5000, как правило, не вызывают иммунного ответа. Однако в лабораторных условиях небольшие молекулы можно присоединить с помощью ковалентной связи к крупным белкам, и этот комплекс в целом будет вызывать иммунный ответ. Такие малые молекулы называются **гаптенами**. Антитела, образующиеся в ответ на введение в организм комплекса белка с гаптенем, способны связываться и со свободными гаптенами. Подобные антитела иногда используют для разработки аналитических тестов, о которых речь пойдет дальше, или в качестве каталитических антител (доп. 6-3). Теперь вернемся к более детальному рассмотрению антител и их способности связываться с антигенами.

Антитела имеют два идентичных центра связывания антигена

Основной класс антител представлен **иммуноглобулинами G (IgG)**; в сыворотке крови на них приходится значительная доля от всего белка. Молекулы IgG построены из четырех полипептидных цепей — двух больших, называемых тяжелыми цепями, и двух легких цепей, которые связаны между собой нековалентными связями и дисульфидными мостиками в крупный комплекс с молекулярной массой 150 000. Тяжелые цепи IgG взаимодействуют между собой на одном конце молекулы, а затем разделяются, и каждая цепь взаимодействует с одной легкой цепью, в результате чего молекула имеет Y-образную структуру (рис. 5-21). Протеазы могут

расщеплять молекулу иммуноглобулина в местах «шарниров», отделяющих «ствол» IgG от его «ветвей». Расщепление папаином приводит к разделению «ствола», называемого **Fc-фрагментом**, поскольку он обычно легко кристаллизуется (от англ. *crystallized fragment*), и двух «ветвей», называемых **Fab-фрагментами** (от англ. *antigen-binding fragment*). На каждом из Fab-фрагментов есть по одному участку связывания антигена.

Структура иммуноглобулинов была впервые определена Джеральдом Эдельманом и Родни Портером. Каждая цепь иммуноглобулина содержит четко идентифицируемые домены, причем некоторые из них обладают одинаковой структурой во всех типах IgG, а другие различаются. Консервативные (константные) домены несут

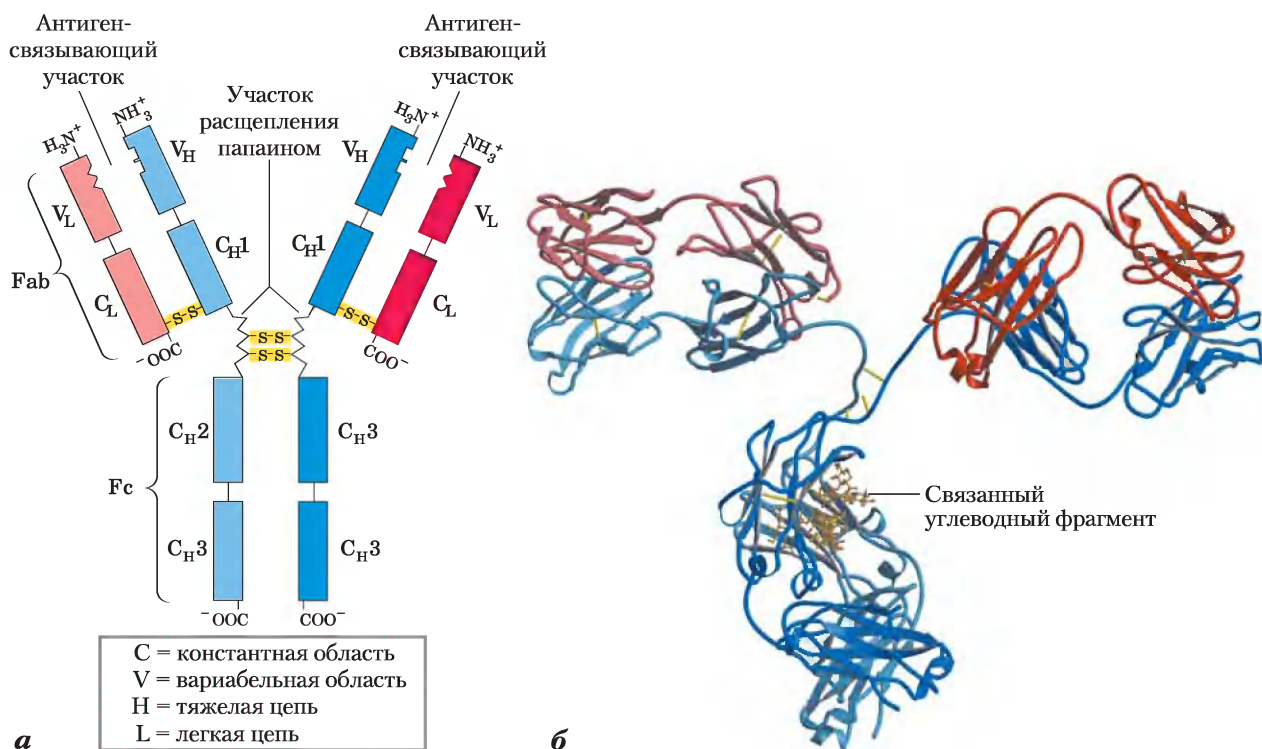


Рис. 5-21. Структура иммуноглобулина G. а) В молекуле IgG пары легких и тяжелых цепей соединяются, образуя Y-образную структуру. Два антигенсвязывающих участка молекулы образуются при комбинации переменных доменов легких (V_L) и тяжелых цепей (V_H). При действии папаина молекула разделяется на Fc- и Fab-фрагменты. Fc-фрагмент молекулы содержит связанный углеводный участок (см. б). б) Ленточная модель первой полной молекулы IgG, которая была кристаллизована (PDB ID 1IGT). Хотя молекула имеет две одинаковые тяжелые цепи (показаны двумя оттенками синего цвета) и две идентичные легкие цепи (два оттенка красного цвета), кристаллическая структура характеризуется асимметричной конформацией. Конформационная гибкость, по всей видимости, играет важную роль в функционировании иммуноглобулинов.

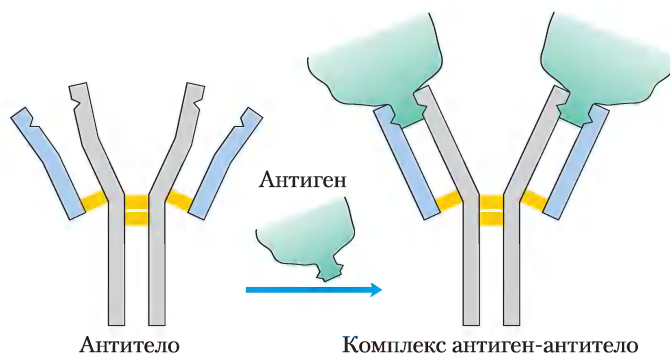


Рис. 5-22. Связывание IgG с антигеном. Для оптимального связывания антигена центр связывания на молекуле IgG часто претерпевает небольшие конформационные изменения. Такое индуцированное соответствие представляет собой общее явление при взаимодействиях белков с лигандами.

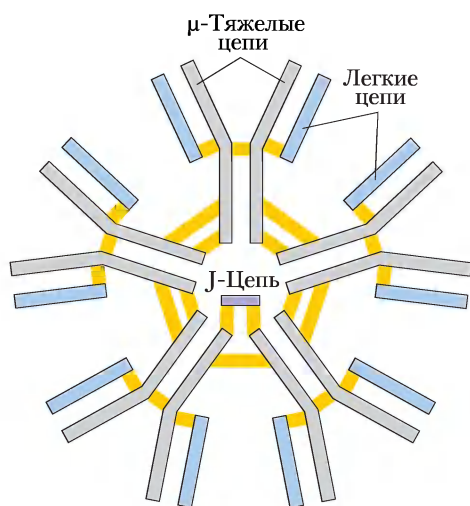


Рис. 5-23. Пентамерная структура IgM. Пентамерная структура удерживается благодаря дисульфидным связям (показаны желтым цветом). J-цепь представляет собой полипептид с $M_r = 20\,000$; эта цепь обнаружена в IgA и IgM.

характерные структурные мотивы, называемые **иммуноглобулиновой складчатостью**, которые встречаются во всех белках с β -структурой (гл. 4). Три константных домена есть в каждой тяжелой цепи, а один — в легкой цепи. Как тяжелые, так и легкие цепи несут по одному варибельному домену, в которых наблюдается максимальное количество аминокислотных замен. Вместе варибельные домены тяжелых и легких цепей образуют центр связывания антигена (рис. 5-21, 5-22).

У многих позвоночных встречается пять классов иммуноглобулинов, и IgG — лишь

один из них. Каждый класс несет свою тяжелую цепь: α , δ , ϵ , γ и μ в IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно. Во всех иммуноглобулинах присутствует один из двух классов легких цепей: κ или λ . Общая структура **IgD** и **IgE** напоминает строение IgG. **IgM** встречается либо в мономерной форме в связанном с мембраной состоянии, либо в секретируемой форме в виде пентамера (рис. 5-23). **IgA** в основном обнаруживается в таких секретах, как слюна, слезы и молоко; они могут существовать в виде мономеров, димеров или тримеров. IgM — это первые антитела, которые начинают вырабатывать В-лимфоциты в процессе созревания, а также основные антитела, появляющиеся на ранних стадиях первичного иммунного ответа. Некоторые В-клетки вскоре переключаются на производство IgD (с тем же центром связывания антигена, что и у ранее синтезированного этой клеткой IgM), однако функции IgD окончательно не выяснены.

Имуноглобулины G являются основными антителами, которые синтезируются при вторичном иммунном ответе, инициируемом В-клетками памяти, т. е. при развитии иммунного ответа на антигены, с которыми иммунная система уже встречалась ранее. При связывании IgG с попавшей в организм бактерией или вирусом они стимулируют некоторые лейкоциты, такие как макрофаги, способные поглощать и разрушать патогенные организмы, а также активируют некоторые другие элементы иммунного ответа. Кроме того, еще один класс рецепторов на поверхности макрофагов узнает и связывает Fc-фрагменты IgG. После связывания

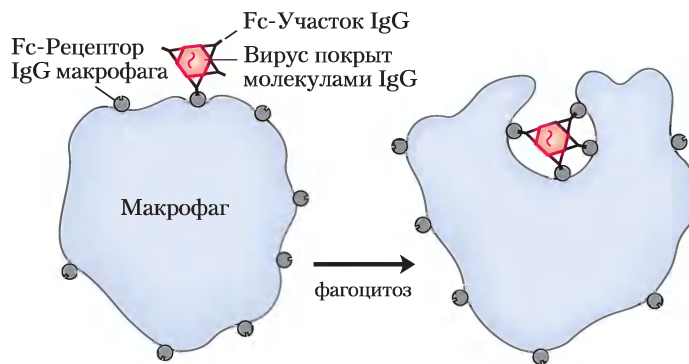


Рис. 5-24. Фагоцитоз вируса, связанного с антителами. Fc-фрагменты антител связываются с Fc-рецепторами на поверхности макрофагов, что приводит к «заглатыванию» и разрушению вируса.

вания Fc-рецепторов с комплексом антитела и патогена макрофаг поглощает этот комплекс путем фагоцитоза (рис. 5-24).

IgE играют важную роль при развитии аллергических реакций: они взаимодействуют с базофилами (фагоцитирующими лейкоцитами) в крови и с часто встречающимися в тканях тучными клетками, секретирующими гистамин. С помощью своего Fc-фрагмента иммуноглобулин E связывается с Fc-рецепторами на базофилах или тучных клетках. В таком состоянии IgE выполняет роль своего рода рецептора антигена. После связывания антигена клетки начинают секретировать гистамин и другие биологически активные амины, способствующие расширению сосудов и повышению их проницаемости. Такое воздействие на сосуды, по всей видимости, облегчает перемещение клеток иммунной системы и белков к местам воспаления, но, кроме того, вызывает симптомы аллергии. Пыльца и другие аллергены воспринимаются организмом как чужеродные вещества и провоцируют иммунный ответ, который в норме направлен на уничтожение патогенов. ■

Антитела связывают антигены прочно и с высокой специфичностью

Специфичность связывания антигенов антителами определяется аминокислотными остатками варибельных областей тяжелых и легких цепей антител. Многие остатки в этих областях меняются от белка к белку, но в разной степени. Некоторые остатки, в частности те, что образу-

ют антигенсвязывающий участок, являются гиперварибельными, т. е. характеризуются особенно сильной изменчивостью. Специфичность связывания определяется химической комплементарностью антигена и его центра связывания на молекуле антитела, а именно формой молекулы и расположением заряженных, неполярных и образующих водородные связи групп. Например, центр связывания, несущий отрицательно заряженную группу, может связывать антиген с положительным зарядом в соответствующей позиции. Во многих случаях комплементарность достигается в результате взаимного влияния антигена и центра связывания, которое возникает по мере их сближения. Конформационные изменения, происходящие при этом в молекуле антитела и (или) антигена, позволяют комплементарным группам взаимодействовать наилучшим образом. Проиллюстрировать сказанное выше можно на примере образования комплекса между пептидом ВИЧ (модельный антиген) и Fab-фрагментом (рис. 5-25). В этом случае особенно хорошо видны структурные изменения, происходящие при связывании антигена.

Обычно связь антитела с антигеном очень прочная — константа диссоциации $K_d \sim 10^{-10}$ (вспомните, что чем ниже K_d , тем прочнее связь). Величина K_d определяется энергией различных ионных, гидрофобных, ван-дер-ваальсовых взаимодействий и водородных связей, стабилизирующих комплекс. Энергия связывания, необходимая для достижения $K_d = 10^{-10}$, примерно равна 65 кДж/моль.



Рис. 5-25. Индуцированное соответствие при связывании антигена с IgG. Изображена поверхность Fab-фрагмента IgG. С ним связывается небольшой пептид вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Чтобы легче было проследить за изменениями структуры молекулы, два остатка тяжелой цепи выделены синим цветом, а один остаток легкой цепи — красным. *а*) Вид сверху на антигенсвязывающий участок Fab-фрагмента IgG (PDB ID 1GGC). *б*) Вид в той же проекции, но теперь Fab-фрагмент находится в конформации, в которой он связывает антиген (PDB ID 1GGI). Сама молекула антигена в данном случае не показана, чтобы удобнее было разглядеть изменения, произошедшие в центре связывания. Обратите внимание, что полость для связывания лиганда расширилась, а некоторые группы изменили свое положение в пространстве. *в*) Тот же вид в присутствии связанного антигена (модель в виде стержней красного цвета).

Взаимодействие антитела с антигеном лежит в основе многих аналитических методов

Необыкновенно высокое сродство и специфичность связывания антител с антигенами лежат в основе широкого применения этой системы в аналитических целях. Используют два типа антител: поликлональные и моноклональные. **Поликлональные антитела** образуются множеством разных В-лимфоцитов в ответ на конкретный антиген, например при введении определенного белка в организм животного. Такие В-лимфоциты образуют

антитела, связывающие специфические, но разные эпитопы антигена. Таким образом, поликлональные препараты представляют собой смесь антител, узнающих разные участки белка. Напротив, **моноклональные антитела** синтезируются популяцией идентичных В-клеток (**клон**), выращенных в клеточной культуре. Эти антитела гомогенны, в том смысле что они связываются с одним и тем же эпитопом. Методы получения моноклональных антител были разработаны Георгом Кёлером и Сезаром Мильштейном.

Специфичность антител находит практическое применение. Определенные антитела можно соединить ковалентной связью с носителем и использовать для колонной хроматографии (рис. 3-17, *в*). При пропускании через колонку смеси белков антитела будут специфическим образом связывать только определенные белки и удерживать их на колонке, в то время как остальные белки будут вымываться. Искомый белок затем можно смыть с колонки раствором соли или другого реагента. Это мощный метод, использующийся для очистки белков.

В другом универсальном аналитическом методе к антителам пришивают радиоактивную



Георг Кёлер, 1946–1995



Сезар Мильштейн,
1927–2002

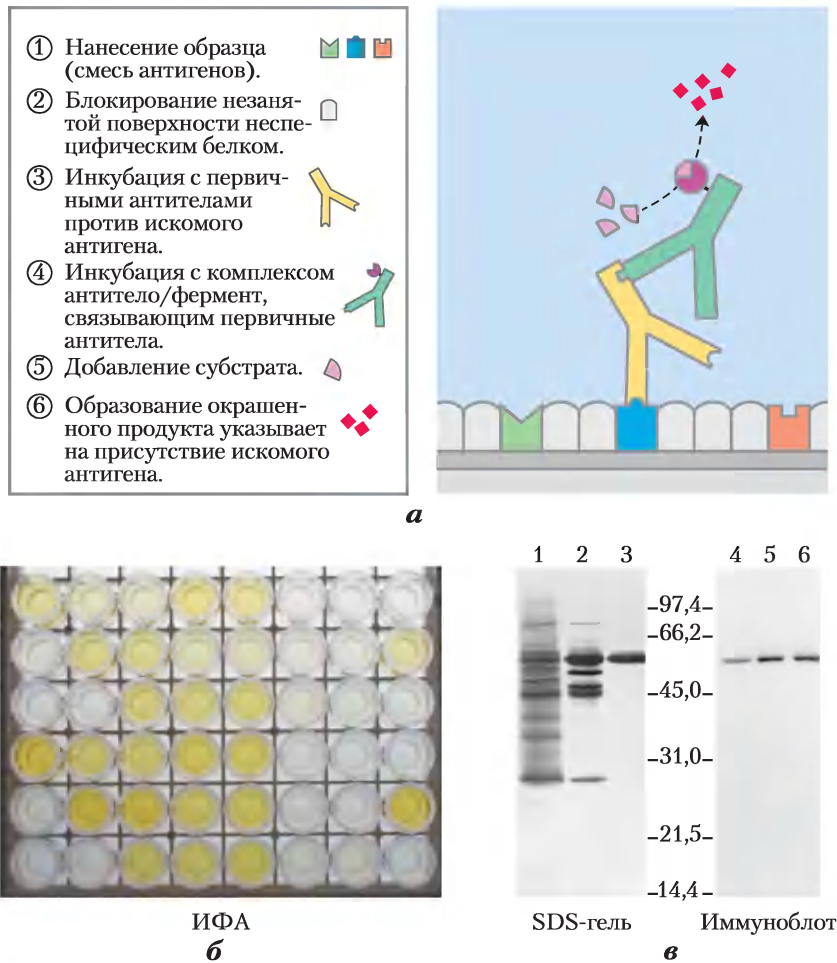


Рис. 5-26. Аналитические методы с использованием антител. Специфическое взаимодействие антитела с антигеном лежит в основе целого ряда методов, использующихся для идентификации и количественного анализа белков в сложных смесях. *а*) Схематическое представление общего подхода. *б*) Определение антител против вируса простого герпеса (HSV) в крови методом ИФА. Лунки покрывают антигеном HSV, с которым связываются антитела против HSV. В качестве вторичных антител используют антитела против IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена. Последовательность шагов приведена на рис. *а*; чем больше антител против HSV содержится в образце крови, тем выше интенсивность желтой окраски в лунке. *в*) Иммуноблот. На дорожках 1–3 нанесены образцы протеинкиназы, полученные на последовательных стадиях очистки. После проведения SDS-электрофореза гель был окрашен с помощью красителя Кумасси синего. На дорожках 4–6 нанесены те же образцы, которые после электрофоретического разделения были перенесены на нитроцеллюлозную мембрану. Затем мембрану в определенных условиях обработали антителами против протеинкиназы. Цифры между фотографиями геля и мембраны указывают расположение маркерных белков с известными молекулярными массами (кДа).

метку или другой маркер, позволяющий легко их идентифицировать. При связывании антител с исследуемым белком по метке можно судить о наличии белка в растворе или о его локализации в геле или даже живой клетке. Некоторые мето-

ды, использующие данный подход, проиллюстрированы на **рис. 5-26**.

Метод твердофазного иммуноферментного анализа **ИФА**, или ELISA (от англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*) позволяет провести

быстрый количественный анализ антигена в образце (рис. 5-26, б). Образец белка наносят на инертную поверхность; чаще всего для этой цели используют 96-луночный полистирольный планшет. Затем лунку промывают раствором недорогого и неспецифического белка (часто используют казеин из обезжиренного сухого молока), чтобы предотвратить адсорбцию белков, добавляемых на следующих стадиях. После этого в лунку вносят раствор первичных антител — антител против искомого белка. Несвязанные антитела отмывают и добавляют раствор антител против первичных антител с ферментативной меткой, позволяющей проводить реакцию с образованием окрашенного продукта. Оставшиеся в растворе вторичные антитела отмывают и добавляют субстрат для связанной со вторичными антителами ферментативной метки. Количество образующегося продукта, определяемое по интенсивности окрашивания, пропорционально концентрации исследуемого белка в образце.

В методе **иммуноблоттинга** (или вестерн-блоттинга) белки, предварительно разделенные с помощью электрофореза, переносят из геля на нитроцеллюлозную мембрану (рис. 5-26, в). Мембрану блокируют неспецифическим белком, как при проведении ИФА, а затем последовательно обрабатывают первичными антителами, вторичными антителами с ферментативной меткой и субстратом. Окрашенный продукт образуется только в тех полосах, где содержится искомым белок. Иммуноблоттинг позволяет детектировать минорные компоненты белковых смесей и приблизительно определять молекулярную массу исследуемого белка. 📄 **Иммуноблоттинг**

В следующих главах мы еще столкнемся с другими аспектами действия антител. Антитела играют очень важную роль в медицине и могут многое сообщить об особенностях белков и генов.

Краткое содержание раздела 5.2

КОМПЛЕМЕНТАРНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ БЕЛКАМИ И ЛИГАНДАМИ: ИММУННАЯ СИСТЕМА И ИММУНОГЛОБУЛИНЫ

■ Иммунный ответ определяется действием специализированных лейкоцитов и связанных с ними белков. Т-лимфоциты синтезируют

Т-клеточные рецепторы. В-лимфоциты синтезируют иммуноглобулины. В процессе клональной селекции Т-хелперные клетки индуцируют пролиферацию В-клеток или цитотоксических Т-клеток, вырабатывающих соответственно иммуноглобулины или Т-клеточные рецепторы, способные связывать определенный антиген.

■ У человека обнаружено пять классов иммуноглобулинов, каждый из которых выполняет свою биологическую функцию. В количественном отношении преобладает IgG. Молекулы IgG имеют Y-образную форму и состоят из двух тяжелых и двух легких цепей. На двух концах молекулы, каждый из которых образован одной тяжелой и одной легкой цепью, расположены гипервариабельные области, формирующие два антигенсвязывающих участка.

■ Иммуноглобулин обычно связывается только с одним участком большого антигена (например, белка) — с эпитопом. Процесс связывания часто сопряжен с конформационными изменениями, приводящими к индуцированному соответствию между антителом и антигеном.

5.3. Энергозависимые взаимодействия белков: актин, миозин и молекулярные моторы

Живые организмы движутся. Клетки движутся. Органеллы и макромолекулы внутри клеток тоже движутся. Основная часть этих движений возможна благодаря активности удивительного класса белков — молекулярных моторов. С помощью химической энергии, источником которой обычно служит АТФ, крупные агрегаты моторных белков претерпевают циклические конформационные изменения; эти изменения складываются в унифицированные, направленные воздействия — от крошечных, разводящих хромосомы в делящейся клетке, до невероятной силы, которую развивает в прыжке камышовый кот массой тела до 20 кг.

Взаимодействия между моторными белками, как вы уже можете предсказать, являются резуль-

татом ионных, гидрофобных, ван-дер-ваальсовых взаимодействий и водородных связей в центрах связывания на молекулах белков. Однако в моторных белках эти взаимодействия достигают невероятно высокого уровня пространственной и временной организации.

Действие моторных белков лежит в основе сокращения мышц, перемещения органелл вдоль микротрубочек, вращения жгутиков бактерий и движения некоторых белков вдоль нити ДНК. Белки кинезины и динеины движутся вдоль микротрубочек в клетке и тянут за собой органеллы или перестраивают хромосомы в процессе деления клетки. Взаимодействие динеина с микротрубочками вызывает движение ресничек и жгутиков эукариотических клеток. Движение жгутиков бактерий связано с активностью сложного вращательного мотора в основании жгутика (рис. 19-39). На различных этапах метаболизма ДНК-хеликазы, полимеразы и другие белки должны перемещаться вдоль молекулы ДНК (гл. 25). В данной главе на примере хорошо известных сократительных белков скелетных мышц позвоночных мы рассмотрим, каким образом белки превращают химическую энергию в движение.

Миозин и актин — основные белки мышц

Движущей силой мышечных сокращений является взаимодействие двух белков — миозина и актина. Эти белки организованы в виде нитей, скольжение которых друг относительно друга приводит к сокращению мышц. Вместе актин и миозин составляют более 80% белковой массы мышц.

Миозин ($M_r \approx 540\,000$) состоит из шести полипептидных цепей — двух тяжелых ($M_r \approx 220\,000$) и четырех легких ($M_r \approx 20\,000$). Тяжелые цепи составляют основу структуры миозина. С-концы тяжелых цепей организованы в виде протяженных α -спиралей и переплетаются между собой, образуя левую суперскрученную спираль, напоминающую спираль α -кератина (рис. 5-27, а). На N-конце каждая тяжелая цепь содержит большой глобулярный домен с участком, на котором происходит гидролиз АТФ. С глобулярными доменами связаны легкие цепи. При быстрой обработке протеазой трипсином длинный «хвост» молекулы миозина расщепляется, в результате чего образуются два фрагмента, называемые тяжелым

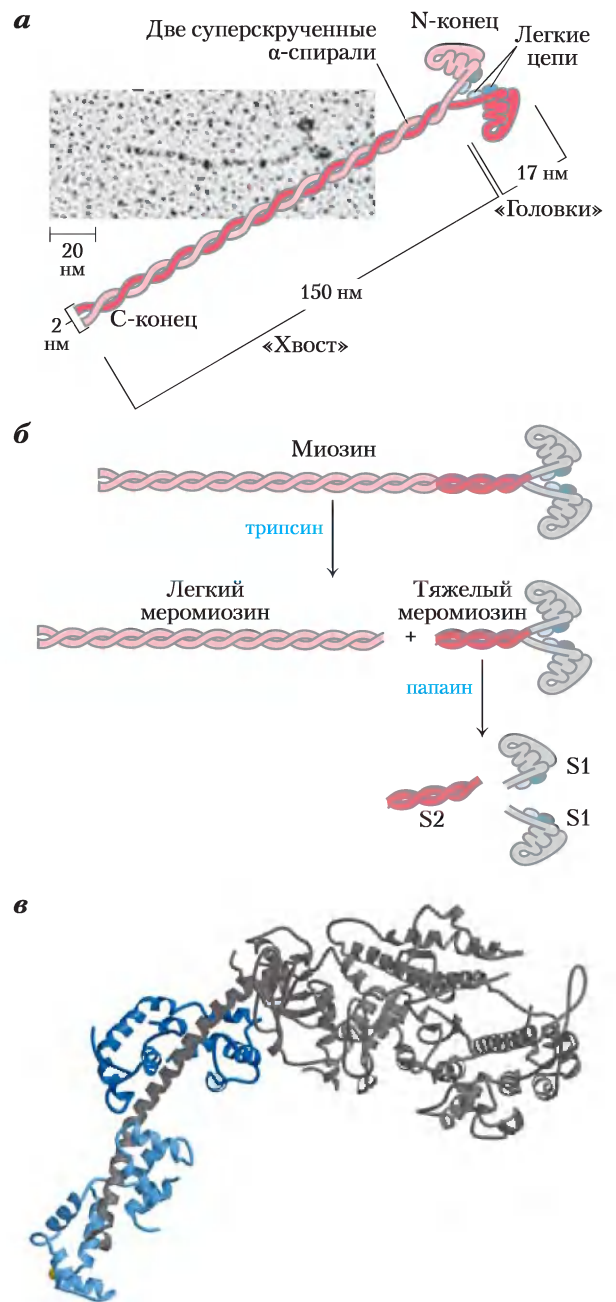


Рис. 5-27. Миозин. а) Миозин имеет две тяжелые цепи (изображены разными оттенками розового цвета), С-концы которых образуют протяженные суперскрученные «хвосты», а N-концы содержат глобулярные домены («головки»). С каждой «головкой» миозина связаны две легкие цепи (показаны синим цветом). б) Расщепление трипсином и папаином приводит к разделению «головки» (S1-фрагмента) и «хвоста» молекулы. в) Ленточная модель S1-фрагмента миозина. Тяжелая цепь изображена серым цветом, две легкие цепи — разными оттенками синего (координаты модели предоставлены Эйвеном Рэйментом).

и легким меромиозином (рис. 5-27, б). Содержащий глобулярную часть субфрагмент S1, или просто «головка» миозина, отделяется от тяжелого меромиозина при обработке папаином. «Головка»

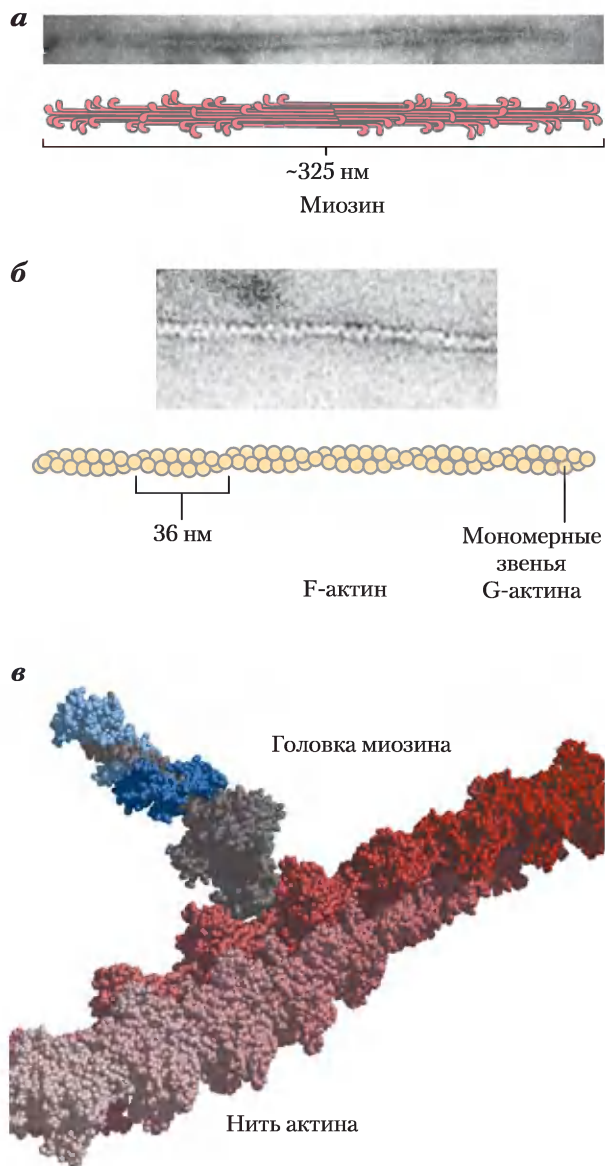


Рис. 5-28. Основные элементы мышц. а) Молекулы миозина агрегируют с образованием биполярных структур, называемых толстыми нитями. б) F-актин представляет собой нить мономерных звеньев G-актина; две нити F-актина навиваются друг на друга, образуя правозакрученную спираль. в) Пространственная модель нити актина (изображена с помощью разных оттенков красного цвета), одно из мономерных звеньев которой связано с «головкой» миозина (синий и серый цвет) (координаты предоставлены Эйвеном Рэйментом).

миозина представляет собой моторный участок, с помощью которого осуществляется сокращение мышц. Фрагмент S1 можно кристаллизовать, его структура определена Эйвеном Рэйментом и Хейзел Холден (рис. 5-27, в).

В клетках мышц молекулы миозина агрегируют, образуя **толстые нити**, или **филаменты** (рис. 5-28, а). Эти палочковидные структуры служат стержнем сократительной единицы. В толстых нитях сотни молекул миозина организованы таким образом, что их «хвосты» образуют длинную биполярную структуру. Глобулярные домены выступают с каждой стороны нити в регулярном порядке.

Вторым важным белком мышц является **актин**, которым богаты практически все эукариотические клетки. В мышцах молекулы мономерного G-актина (глобулярный актин; $M_r = 42\,000$) связаны в длинные полимерные цепи F-актина (фибрилярный актин). **Тонкие нити (филаменты)** (рис. 5-28, б) образованы F-актином при участии белков тропонина и тропомиозина. Формирование тонких нитей происходит по мере последовательного присоединения мономерных молекул актина к одному концу. Кроме того, каждая молекула актина связывает молекулу АТФ и гидролизует ее до АДФ, так что каждый мономер актина в составе нити находится в комплексе с АДФ. Таким образом, гидролиз АТФ под действием актина происходит только при сборке нитей; АТФ не передает энергию непосредственно в момент сокращения мышц. Каждый мономер актина в составе тонкой нити может специфически и прочно связываться с одной головкой молекулы миозина (рис. 5-28, в).

Упорядоченные структуры тонких и толстых нитей образуются при участии других белков

Скелетные мышцы состоят из параллельных пучков **мышечных волокон**. Каждое волокно представляет собой одну очень большую многоядерную клетку диаметром от 20 до 100 мкм. Эти клетки образуются в результате слияния многих клеток и часто распространяются на длину всей мышцы. Волокно состоит примерно из 1000 **миофибрилл** диаметром 2 мкм, каждая из которых содержит огромное количество регулярным образом упакованных тонких и толстых нитей в комплексе

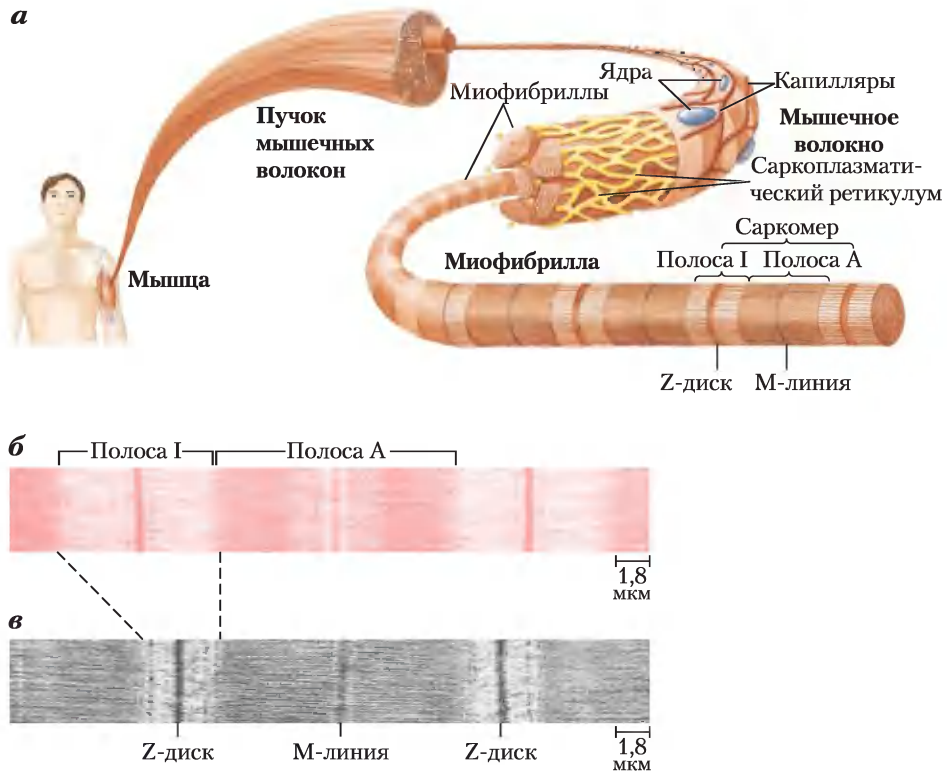


Рис. 5-29. Структура скелетных мышц. а) Мышечное волокно состоит из одной вытянутой многоядерной клетки, образующейся в результате слияния многих клеток-предшественников. Внутри волокна множество миофибрилл (на данном рисунке для простоты их изображено только шесть) окружены мембраной саркоплазматического ретикулума. В электронный микроскоп видны полосы, образованные тонкими и толстыми нитями миофибрилл. При сокращении мышцы полоса I сужается и соседние Z-диски сближаются друг с другом; б) расслабленная мышца; в) мышца в сокращенном состоянии.

с другими белками (рис. 5-29). Каждую миофибриллу окружает система плоских мембранных везикул — **саркоплазматический ретикулум**. В электронный микроскоп в мышечном волокне можно различить чередующиеся области высокой и низкой электронной плотности, называемые **полосами А и I** (рис. 5-29, б, в). Эти полосы возникают в результате особой укладки тонких и толстых нитей, при которой они частично перекрываются. Полоса I представляет собой область пучка, который в поперечном сечении состоит только из тонких нитей. Более темная полоса А соответствует участку сосредоточения толстых нитей, а также включает в себя места перекрывания параллельно идущих тонких и толстых нитей. Полоса I в середине разделена **Z-диском** — тонкой структурой, расположенной перпендикулярно к оси тонкой нити и служащей в качестве якоря, к которому

прикрепляются тонкие нити. Полоса А в свою очередь также разделена посередине линией М, или **М-диском**, — областью высокой электронной плотности в центре толстых нитей. Целиком вся сократительная единица, состоящая из пучков толстых нитей, перемежающихся на обоих концах с пучками тонких нитей, называется **саркомером**. Перемежающееся расположение пучков позволяет тонким и толстым нитям скользить друг относительно друга (механизм см. ниже), в результате чего происходит постепенное сокращение каждого саркомера (рис. 5-30).

Тонкие нити актина одним концом прикреплены к Z-диску. В образовании этого контакта участвуют также белки **α -актинин**, **десмин** и **винентин**. Тонкие нити, кроме того, содержат гигантский белок **небулин** (состоит примерно из 7000 аминокислотных остатков), который, как

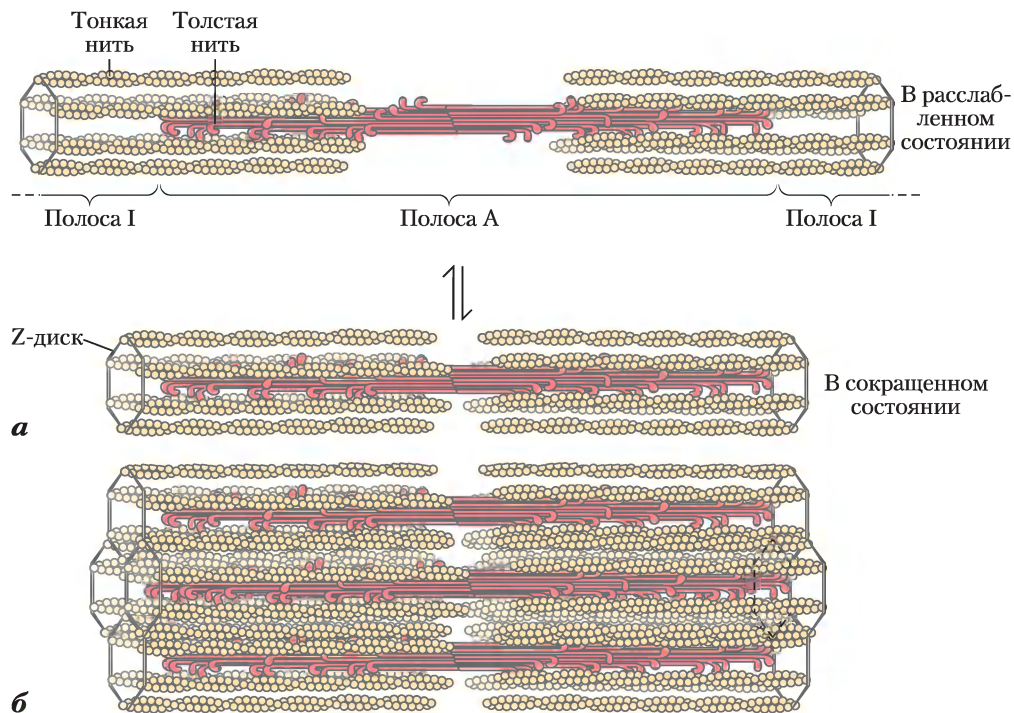


Рис. 5-30. Сокращение мышцы. Толстые филаменты (нити) представляют собой биполярные структуры, образованные в результате ассоциации большого числа молекул миозина. а) Мышечное сокращение происходит в результате скольжения тонких и толстых нитей друг относительно друга, так что Z-диски соседних полос I сближаются. б) Тонкие и толстые нити перемежаются, так что каждая толстая нить окружена шестью тонкими.

полагают, организован в виде α -спирали, перекрывающей длину всей нити. Аналогичным образом М-линия организует толстые филаменты. В этом участвуют такие белки, как **парамиозин**, **С-белок** и **М-белок**. Еще один класс белков — **титины** — наиболее крупные из известных на сегодняшний день белков, состоящих из единственной полипептидной цепи (титин сердечной мышцы человека состоит из 26 926 аминокислотных остатков). Титин связывает толстые филаменты с Z-дисксом, обеспечивая дополнительный уровень организации всей структуры. Считается, что небулин и титин служат своего рода «молекулярной линейкой», регулирующей длину и толщину тонких и толстых филаментов соответственно. Титин простирается от Z-диска до М-линии, регулируя длину самого саркомера и предотвращая перерастяжение мышцы. Длина саркомера в разных тканях различается, что, в частности, связано с наличием в организме позвоночных нескольких вариантов титина.

Толстые нити миозина скользят по тонким нитям актина

Взаимодействие между актином и миозином, как и всех белков с лигандами, основано на действии слабых сил. Если с миозином не связана молекула АТФ, то головка миозина связывается с актином (рис. 5-31). Если миозин связывает молекулу АТФ и гидролизует ее до АДФ и фосфата, происходит циклическая серия конформационных изменений, при которых миозин высвобождает одну субъединицу F-актина и связывает следующую за ней.

Этот цикл состоит из четырех основных стадий (рис. 5-31). На стадии 1 молекула АТФ связывается с миозином, актомиозиновый комплекс распадается и актин высвобождается. На стадии 2 молекула АТФ гидролизует, вызывая конформационные изменения в белке и его переход в состояние с более высоким уровнем энергии, в результате чего «головка» миозина поворачивается и меняет свою ориентацию относительно нити актина. Затем между «головкой» миозина и следую-

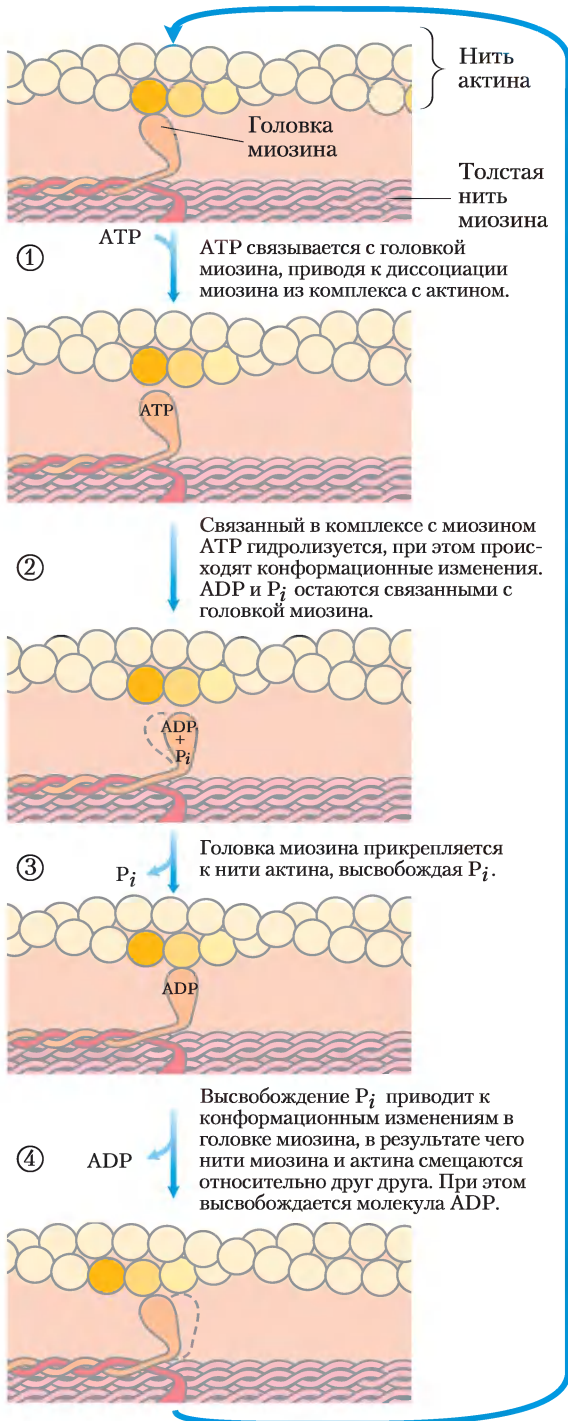


Рис. 5-31. Молекулярный механизм мышечного сокращения. Конформационные изменения в «головке» миозина, сопряженные с циклом гидролиза АТФ, приводят к диссоциации миозина из комплекса с одной субъединицей актина и его связыванию с другой, расположенной дальше вдоль тонкой нити. Так происходит скольжение толстых нитей вдоль тонких (см. рис. 5-30).

щим мономерным звеном актина, расположенным ближе к Z-диску, возникает слабая связь. На стадии 3 от миозина отсоединяется фосфат, образовавшийся в процессе гидролиза АТФ, что сопряжено с очередным конформационным изменением в молекуле миозина, приводящим к более прочному взаимодействию в актомиозиновом комплексе. Далее на стадии 4 «головка» миозина приходит в исходное состояние, так что в результате «хвост» миозина смещается относительно нити актина в сторону Z-диска. В завершение цикла высвобождается молекула ADP. В результате каждого такого цикла совершается работа, эквивалентная 3–4 пН, и толстая нить смещается относительно тонкой нити на 5–10 нм.

На толстой нити находится множество «головок» миозина, и в каждый конкретный момент лишь немногие из них (вероятно, 1–3%) связаны с тонкими нитями. Это не позволяет толстой нити проскальзывать назад в тот момент, когда отдельная «головка» миозина высвобождает субъединицу актина, с которой была связана. Таким образом толстые нити активно сдвигаются относительно тонких нитей. Этот процесс, скоординированный во всех саркомерах мышечного волокна, приводит к сокращению мышцы.

Взаимодействие между актином и миозином должно регулироваться таким образом, чтобы мышечное сокращение происходило только в ответ на соответствующий сигнал нервной системы. Эта регуляция осуществляется с помощью двух белков — **тропомиозина** и **тропонина** (рис. 5-32). Тропомиозин связывается с тонкими нитями и блокирует центры связывания «головок» миозина. Тропонин является Ca^{2+} -связывающим белком. Нервный импульс вызывает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Ионы Ca^{2+} связываются с тропонином (еще один пример взаимодействия белка с лигандом), что приводит к конформационным изменениям в комплексе тропонина с тропомиозином, в результате которых освобождается участок связывания миозина на тонкой нити. Происходит мышечное сокращение.

При работе скелетных мышц белки выполняют две свои обычные функции — связывание и катализ. Взаимодействие актина с миозином и иммуноглобулинов с антигенами — это частные случаи взаимодействия белка с лигандом. Эти процессы обратимы, и после их завершения участники процессов остаются в неизменном виде. Од-

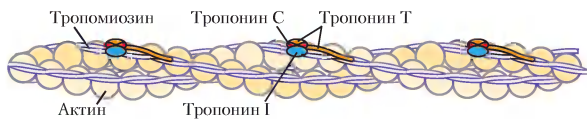


Рис. 5-32. Регуляция мышечного сокращения тропомиозином и тропонином. Тропомиозин и тропонин связаны с F-актином в тонких мышечных волокнах. При расслаблении мышцы оба белка располагаются вокруг актинового волокна, блокируя участки связывания миозина. Тропомиозин представляет собой α -спиральный белок, состоящий из двух пептидов, образующих двойную спираль (тот же структурный мотив, что и в α -кератине; рис. 4-10). Он образует полимеры типа «голова-хвост», которые закручиваются вокруг двух цепей актина. Тропомиозин соединяется к комплексу актин/тропомиозин через различные интервалы 38,5 нм. Тропонин состоит из трех различных субъединиц: I, С и Т. Тропонин I предотвращает связывание головки миозина с актином; тропонин С содержит центр связывания ионов кальция, а тропонин Т связывает весь тропониновый комплекс с тропомиозином. Когда мышца получает сигнал начать сокращение, из саркоплазматического ретикулума высвобождаются ионы кальция (рис. 5-29, а) и связываются с тропонином С. Это приводит к конформационным изменениям в тропонине С, который меняет положение тропонина I и тропомиозина таким образом, что ингибирование тропонином I снимается, и мышечное сокращение становится возможным.

нако связавшийся с миозином АТФ подвергается гидролизу до АДФ и неорганического фосфата. Таким образом, миозин — это не просто белок, связывающий актин, но еще и фермент (АТРаза). Каталитическая активность ферментов является предметом обсуждения в следующей главе.

Краткое содержание раздела 5.3

ЭНЕРГОЗАВИСИМЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ: АКТИН, МИОЗИН И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОТОРЫ

■ В моторных белках взаимодействие белка с лигандом достигает особенно высокой степени пространственной и временной организации. Мышечное сокращение является результатом тонкого взаимодействия между миозином и актином, сопряженного с гидролизом АТФ под действием миозина.

■ Миозин состоит из двух тяжелых и четырех легких цепей, образующих длинный спиральный домен («хвост») и глобулярный домен

(«головку»). Молекулы миозина организованы в виде толстых нитей, способных скользить вдоль тонких нитей, основой которых является актин. Гидролиз АТФ под действием миозина приводит к серии конформационных изменений в «головке» миозина, в результате чего миозин диссоциирует из комплекса с одной субъединицей актина и образует комплекс с другой, расположенной дальше вдоль тонкой нити. Таким образом, нити миозина скользят по тонким нитям актина.

■ Сокращение мышцы стимулируется высвобождением Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Ионы Ca^{2+} связываются с белком тропонином, приводя к конформационным изменениям в комплексе тропонина с тропомиозином и инициируя цикл взаимодействий актина с миозином.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

В-лимфоцит (В-клетка)	Константа ассоциации (K_a) 229
249	
Т-лимфоцит (Т-клетка)	Константа диссоциации (K_d) 231
249	
Актин 258	Лиганд 225
Аллостерический белок 237	Лимфоцит 249
Антиген 250	Миозин 257
Антитело 249	Моноклональные антитела 254
Гаптен 250	
Гем 227	Поликлональные антитела 254
Глобины 228	
Иммуноглобулин 251	Порфирин 227
Иммуноглобулиновая складчатость 252	Саркомер 259
Индукцированное соответствие 226	Уравнение Хилла 239
ИФА 255	Центр связывания 225
	Эффект Бора 243
	Эпитоп 250

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

O_2 -Связывающие белки

Ackers, G.K. & Hazzard, J.H. (1993) Transduction of binding energy into hemoglobin cooperativity. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 385–390.

Changeux, J.-P. (1993) Allosteric proteins: from regulatory enzymes to receptors — personal recollections. *Bioessays* **15**, 625–634.

Интересный обзор, написанный лидером в данной области биохимии.

Koshland, D.E., Jr., Nemethy, G., & Filmer, D. (1996) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* **6**, 365–385.

Работа, в которой была предложена последовательная модель связывания.

Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J.-P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**, 88–118.

В этой статье впервые была предложена симметричная модель.

Olson, J.S. & Phillips, G.N., Jr. (1996) Kinetic pathways and barriers for ligand binding to myoglobin. *J. Biol. Chem.* **271**, 17593–17596.

Perutz, M.F. (1989) Myoglobin and haemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 42–44.

Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M. & Dodson, G.G. (1998) The stereochemical mechanism of the cooperative effects in haemoglobin revisited. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 1–3.

Squires, J.E. (2002) Artificial blood. *Science* **295**, 1002–1005.

Хорошее описание впечатляющих технических возможностей имитации высокоразвитой способности переноса кислорода кровью.

Белки иммунной системы

Cooper, M.D. & Alder, M.N. (2006) The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815–822.

Интересная заметка о происхождении нашей иммунной системы.

Davies, D.R. & Chacko, S. (1993) Antibody structure. *Acc. Chem. Res.* **26**, 421–427.

Davies, D.R., Padlan, E.A., & Sheriff, S. (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439–473.

Kindt, T.J., Osborne, B.A., & Goldsby, R.A. (2007) *Kuby Immunology*, 6th edn, W. H. Freeman and Company, New York.

Thomsen, A.R., Nansen, A., & Christensen, J.P. (1998) Virus-induced T cell activation and the inflammatory response. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **231**, 99–123.

Yewdell, J.W. & Haeryfar, S.M.M. (2005) Understanding presentation of viral antigens to CD8(+) T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 651–682.

Молекулярные моторы

Finer, J.T., Simmons, R.M., & Spudich, J.A. (1994) Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature* **368**, 113–119.

Современные методы изучения движущих сил, действующих в моторных белках.

Greeves, M.A. & Holmes, K.C. (1999) Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 687–728.

Huxley, H.E. (1998) Getting to grips with contraction: the interplay of structure and biochemistry. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 84–87.

Интересный исторический обзор, посвященный расшифровке механизма мышечного сокращения.

Labeit, S. & Kolmerer, B. (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* **270**, 293–296.

Исследование структуры и функций некоторых самых крупных белков.

Molloy, J.E. & Veigel, C. (2003) Myosin motors walk the walk. *Science* **300**, 2045–2046.

Rayment, I. (1996) The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 15850–15853.

Исследование механизма мышечного сокращения с точки зрения структурных изменений.

Rayment, I. & Holden, H.M. (1994) The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 129–134.

Spudich, J.A. (1994) How molecular motors work. *Nature* **372**, 515–518.

Vale, R.D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467–480.

Вопросы и задачи

1. Связь между сродством и константой диссоциации. Белок А связывает лиганд X в центре связывания с константой диссоциации $K_d = 10^{-6}$ М. Белок В связывает лиганд X в центре связывания с константой диссоциации $K_d = 10^{-9}$ М. Какой белок обладает большим сродством к лиганду X? Объясните свой ответ. Выразите константу диссоциации K_d через константу ассоциации K_a и определите константы ассоциации для обоих белков А и В.

2. Отрицательная кооперативность. В какой из описанных ниже ситуаций график Хилла покажет значение $n_H < 1$? Поясните свой ответ в каждом случае.

а) Белок состоит из нескольких субъединиц, каждая из которых имеет один центр связывания лиганда. Связывание лиганда с одним центром ослабляет сродство к лиганду других центров.

б) Белок состоит из единственного полипептида с двумя центрами связывания лиганда, имеющими разное сродство к лиганду.

в) Белок состоит из единственного полипептида с одним центром связывания лиганда. В результате очистки получают гетерогенный препарат белка: часть белка денатурирована и в результате имеет более низкое сродство к лиганду.

3. Сродство гемоглобина к кислороду. Какое влияние окажут на сродство гемоглобина к кислороду следующие изменения?

а) Снижение значения рН крови с 7,4 до 7,2.

б) Снижение парциального давления CO_2 в легких с 6 кПа (при задержке дыхания) до 2 кПа (в норме).

в) Увеличение содержания БФГ с 5 мМ (на нормальных высотах) до 8 мМ (на больших высотах).

г) Увеличение содержания СО от неопасного уровня в 1,0 ppm до 30 ppm в воздухе внутри помещения с плохой печной тягой.

4. Обратимое связывание лиганда. Белок кальциневрин связывается с белком кальмодулином с константой скорости $8,9 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ и константой диссоциации $K_d = 10 \text{нМ}$. Рассчитайте константу скорости диссоциации k_d .

5. Кооперативность действия гемоглобина. При определенных условиях гемоглобин диссоциирует на четыре субъединицы. Отдельная α -субъединица связывает кислород, однако кривая связывания имеет гиперболический, а не S-образный вид. Кроме того, на связывание кислорода с отдельной α -субъединицей не влияет присутствие H^+ , CO_2 и БФГ. Что на основании данных наблюдений можно сказать о природе кооперативности гемоглобина?

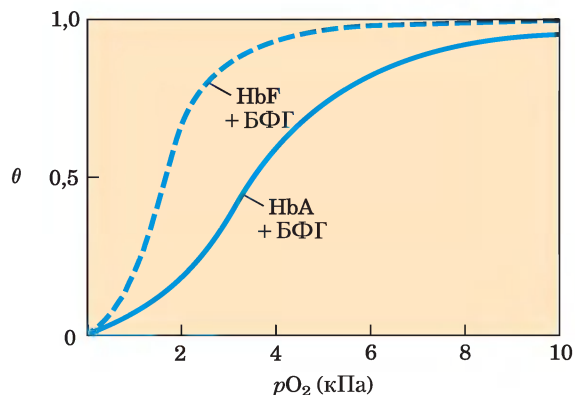
6. Сравнение свойств гемоглобина матери и плода. Изучение переноса кислорода в организме беременных женщин показало, что кривые связывания кислорода гемоглобином матери и плода, полученные при одних и тех же условиях, сильно различаются. Эритроциты плода содержат структурный вариант гемоглобина (HbF), состоящий из двух α - и двух γ -субъединиц ($\alpha_2\gamma_2$), в то время как

гемоглобин матери (HbA) состоит из двух α - и двух β -субъединиц ($\alpha_2\beta_2$).

а) Какой гемоглобин (HbA или HbF) и почему имеет более высокое сродство к кислороду в физиологических условиях?

б) В чем физиологический смысл различного сродства к кислороду этих вариантов гемоглобина?

в) Если из препаратов HbA и HbF тщательно удалить БФГ, то экспериментальные кривые связывания кислорода сдвинутся влево (следовательно, изменится и сродство к кислороду). Но теперь HbA имеет более высокое сродство к кислороду, чем HbF. Если вновь добавить БФГ, то кривые связывания кислорода вернуться к исходным положениям, как показано на рисунке. Какое влияние оказывает БФГ на сродство гемоглобина к кислороду? Как с помощью данной информации объяснить различное сродство к кислороду гемоглобинов матери и плода?



7. Различные формы гемоглобина. В природе существует почти 500 форм гемоглобина. Большинство гемоглобинов различаются всего одним аминокислотным остатком в полипептидной цепи. Наличие некоторых форм сопряжено с определенными заболеваниями, однако далеко не все варианты гемоглобина вызывают болезнь. Ниже перечислены некоторые формы гемоглобина.

HbS (серповидный гемоглобин): Val замещает Glu на поверхности молекулы;

Hb Cowtown: отсутствует ионная пара, стабилизирующая состояние T;

Hb Memphis: одно полярное незаряженное основание на поверхности молекулы заменено на другое, близкое по размеру;

- Hb Bibba: Pro замещает Leu в α -спиральном участке;
- Hb Milwaukee: Glu замещает Val;
- Hb Providence: Asn заменяет Lys, обычно находящийся в центральной полости тетрамера;
- Hb Philly: Phe заменяет Tyr, что приводит к нарушению водородных связей на поверхности $\alpha_1\beta_1$.

Объясните, какой вариант (варианты) и почему:


- с наименьшей вероятностью связан с проявлением патологических симптомов;
- имеет другое значение pI , чем HbA;
- с наибольшей вероятностью обладает пониженным сродством к БФГ и повышенным сродством к кислороду.

8. Связывание кислорода и структура гемоглобина. Группа биохимиков с помощью генно-инженерных методов пытается модифицировать область контакта между отдельными субъединицами гемоглобина. Получившиеся варианты гемоглобина существуют в растворе главным образом в виде $\alpha\beta$ -димеров и очень небольшого количества тетрамерных форм. Такой гемоглобин сильнее или слабее связывает кислород? Объясните свой ответ.

9. Обратимое связывание антител. Антитело связывается с антигеном с константой $K_d = 5 \cdot 10^{-8}$ М. При какой концентрации антигена параметр θ равен:

- 0,2;
- 0,5;
- 0,6;
- 0,8?

10. Использование антител при изучении связи структуры и функции белков. Моноклональные антитела связываются с G-актином, но не связываются с F-актином. Что в связи с этим вы можете сказать об эпитопе, узнаваемом данными антителами?

 **11. Иммунная система и вакцины.** Организму хозяина требуется определенное время, иногда несколько дней, чтобы сформировать иммунный ответ на новый антиген. А с помощью клеток памяти иммунная реакция на ранее уже встречавшийся патоген развивается очень быст-

ро. Вакцины, действие которых направлено против определенной вирусной инфекции, могут содержать ослабленный или убитый вирус, а также отдельные белки из защитной оболочки вируса. При введении в организм человека вакцина обычно не вызывает инфекции или болезненного состояния, но лишь «обучает» иммунную систему распознавать данные вирусные частицы, стимулируя образование клеток памяти. Если через какое-то время человек столкнется с данной инфекцией, то эти клетки будут связывать вирусные частицы и способствовать формированию быстрого иммунного ответа. Некоторые патогены, в том числе и ВИЧ, выработали механизмы борьбы с иммунной системой, что делает сложным или практически невозможным создание против них эффективных вакцин. Какую стратегию может применять патоген, чтобы ускользнуть от уничтожения иммунной системой? Считайте, что антитела и (или) Т-клеточные рецепторы способны связываться с любой структурой, которая появляется на поверхности патогена, и что связанный патоген обязательно уничтожается.

12. О трупном окоченении. Когда высшее позвоночное животное умирает, его мышцы лишаются АТФ и теряют эластичность — это состояние называется трупным окоченением. Объясните молекулярные основы данного явления.

13. Другой взгляд на саркомеры. Толстые и тонкие нити в саркомере организованы таким образом, что шесть тонких нитей обычно окружают каждую толстую нить, образуя в поперечном срезе гексаэдр. Изобразите поперечный срез миофибриллы в следующих точках:

- вдоль линии М;
- в области полосы I;
- в плотной области полосы А;
- в менее плотной области полосы А, прилегающей к линии М (см. рис. 5-29, б, в).

Биохимия в Интернете

14. Лизоцим и антитела. Чтобы лучше понять действие белков в клетке, полезно рассмотреть в трехмерном изображении взаимодействие белков с другими компонентами клетки. К счастью, теперь это можно сделать с помощью белковых

баз данных в Интернете и программ визуализации трехмерной структуры молекул. Некоторые программы требуют скачивания и отладки, другие плохо работают под определенными операционными системами и браузерами, некоторые требуют использования командной строки, интерфейс других более удобен. Мы советуем зайти на сайт www.umass.edu/microbio/rasmol и искать информацию о программах RasMol, Protein Explorer и Jmol First Glance. Выберите программу визуализации, наиболее подходящую для вашей операционной системы, браузера и уровня необходимой точности. Затем скачайте и установите те программы и плагины, которые могут вам понадобиться.

В данном примере вы будете изучать взаимодействия фермента лизоцима (гл. 4) и Fab-фрагмента антител против лизоцима. Используйте идентификационный номер PDB 1FDL для изучения структуры комплекса Fab-фрагмента IgG1 с лизоцимом (комплекс антиген/антитело). Ответьте на вопросы, используя информацию из таблиц структур (structure summary page) в базе Protein Data Bank (www.rcsb.org) и посмотрите на изображение структуры, используя RasMol, Protein Explorer или Jmol First Glance.

а) Какие цепи в трехмерной модели принадлежат фрагменту антитела, а какие антигену (лизоциму)?

б) Какая вторичная структура преобладает в данном Fab-фрагменте?

в) Сколько аминокислотных остатков содержится в легких и тяжелых цепях Fab-фрагмента? В молекуле лизоцима? Какая доля молекулы лизоцима реагирует с антигенсвязывающим участком фрагмента антитела?

г) Идентифицируйте специфические аминокислотные остатки в молекуле лизоцима и в переменных областях легких и тяжелых цепей Fab-фрагмента, которые расположены в области взаимодействия антитела и антигена. Расположены ли эти области рядом в первичных последовательностях полипептидных цепей?

15. Изучение обратимых взаимодействий белков с лигандами с помощью динамических графиков. 🧠 Для решения этого задания воспользуйтесь графиками для уравнений 5-8, 5-11, 5-14 и 5-16.

а) Обратимое связывание лиганда с простым белком (без кооперативности). Для урав-

нения 5-8 постройте графики в координатах θ от $[L]$ (соответственно вертикальная и горизонтальная оси), соответствующие значениям K_d , равным 5, 10, 20 и 100 мкМ. Предположите, что эти четыре константы соответствуют связыванию четырех разных белков с лигандом L. Какой из данных белков обладает более высоким сродством к лиганду?

Рассмотрите график для $K_d = 10$ мкМ. Как сильно увеличивается θ при увеличении $[L]$ от 0,2 до 0,4 мкМ? Как сильно увеличивается θ при увеличении $[L]$ от 40 до 80 мкМ?

Вы можете сделать то же упражнение для уравнения 5-11. Переведите $[L]$ в pO_2 , а K_d в P_{50} . Проанализируйте кривые для значений P_{50} 0,5, 1,0, 2,0 и 10 кПа. Для кривой, соответствующей $P_{50} = 1,0$ кПа, определите, как сильно изменяется θ при увеличении pO_2 от 0,02 до 0,04 кПа и от 4 до 8 кПа.

б) Кооперативное связывание лиганда с мультисубъединичным белком. Используя уравнение 5-14, постройте кривую связывания белка с лигандом в случае $K_d = 10$ мкМ и $n = 3$. Обратите внимание на определение K_d в уравнении 5-16. На том же графике изобразите кривую для $K_d = 20$ мкМ и $n = 3$. Пусть теперь $n = 4$; посмотрите, как ведут себя обе кривые. Постройте график Хилла для каждого случая (уравнение 5-16). Определите значение θ при $[L] = 40$ мкМ в случае $K_d = 10$ мкМ и $n = 3$.

в) Проанализируйте данные уравнения, изменяя все использованные в них параметры.

Анализ экспериментальных данных

16. Функции белка. В 1980-е гг. структуры актина и миозина были известны только в ограниченном разрешении, как изображено на рис. 5-28, а, б. Было известно, что фрагмент миозина S1 связывается с актином и гидролизует АТФ, но постоянно велись дебаты по поводу участка в молекуле миозина, в котором возникает сокращение. Были предложены две конкурирующие модели, описывающие механизм возникновения сокращения в молекуле миозина.

В «шарнирной модели» фрагмент S1 связывался с актином, но тяговое усилие создавалось в результате сокращения «шарнирного участка» в хвосте молекулы миозина.

Шарнирный участок расположен в области тяжелого меромиозина, примерно там, где трипсин отщепляет легкий меромиозин (см. рис. 5-27, б). На рис. 5-27, а этой области соответствует подпись «две суперскрученные α -спирали». В «модели S1» предполагалось, что тяговое усилие формируется в самой S1-«головке», а «хвост» служит лишь для поддержания структуры молекулы.

Было проведено множество экспериментов, но окончательно механизм сокращения понят не был. В 1987 г. Джеймс Спудич и его сотрудники из Стэнфордского университета опубликовали работу, которая хотя и не дала окончательного ответа на вопрос, но указала путь его решения.

Метод рекомбинантных ДНК не был тогда развит настолько, чтобы изучать механизм сокращения в условиях *in vivo*, поэтому Спудич с сотрудниками предложили интересную модель для исследований *in vitro*. Водоросль *Nitella* имеет чрезвычайно длинные клетки — часто до нескольких сантиметров в длину и около 1 мм в диаметре. Волокна актина протянуты вдоль длинной оси этих клеток, и клетки можно разрезать вдоль таким образом, чтобы увидеть волокна. Спудич обнаружил, что в присутствии АТФ покрытые миозином пластиковые шарики перемещаются вдоль актиновых волокон, точно так, как миозин в сокращающейся мышце.

Было предложено усовершенствовать способ прикрепления миозина к шарикам. «Шариками» служили агрегаты убитых бактерий *Staphylococcus aureus*. На поверхности этих клеток находится белок, который связывается с Fc-фрагментом антител (рис. 5-21, а). Антитела в свою очередь связываются с несколькими (неизвестными) участками в «хвосте» молекулы миозина. Комплекс, состоящий из шариков, антител и интактных молекул миозина, в присутствии АТФ перемещался вдоль актиновых волокон клеток *Nitella*.

а) Изобразите схематично, как на молекулярном уровне мог бы выглядеть комплекс шарик-антитела-миозин.

б) Почему для перемещения шариков вдоль актиновых волокон необходим АТФ?

в) Спудич с сотрудниками использовали антитела, связывающиеся с «хвостом» молеку-

лы миозина. Почему этот эксперимент не удался бы, если бы они использовали антитела, связывающиеся с «головкой» S1, которая обычно связана с актином? Почему эксперимент не удался бы, если бы они использовали антитела, связывающиеся с актином?

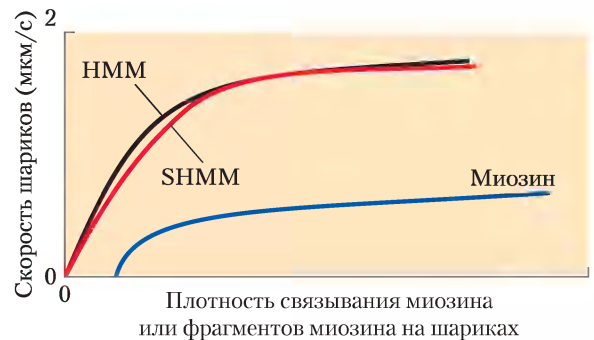
Чтобы понять, в какой части молекулы миозина возникает движущая сила сокращения, Спудич с сотрудниками использовали трипсин, расщепляющий миозин на две части (см. рис. 5-27):

1) тяжелый меромиозин (НММ), образующийся при краткосрочном воздействии трипсина, и

2) короткий тяжелый меромиозин (SHMM), образующийся при более длительной обработке НММ трипсином. НММ содержит «головку» S1 и часть «хвоста», включая шарнирную область; SHMM содержит «головку» S1 и более короткий участок «хвоста» без шарнирной области. При краткосрочном действии трипсина в результате расщепления единственной пептидной связи в молекуле миозина образуются НММ и легкий меромиозин (рис. 5-27).

г) Почему трипсин в первую очередь атакует именно эту пептидную связь в молекуле миозина?

Спудич с сотрудниками приготовили комплексы из шариков, антител и миозина, варьируя количество миозина, НММ и SHMM, и измеряли скорость их перемещения вдоль актиновых волокон *Nitella* в присутствии АТФ. Ниже на графике представлены качественные результаты этого эксперимента.



д) Какая из моделей (S1 или шарнирная модель) согласуется с полученными результатами? Объясните свой ответ.

е) Объясните, почему скорость перемещения шариков возрастала с увеличением плотности миозина.

ж) Объясните, почему при высокой плотности миозина скорость перемещения шариков больше не увеличивалась.

При наиболее полном расщеплении трипсином, необходимом для получения SHMM, происходило также расщепление полипептидной цепи миозина в области «головки» S1.

з) Учитывая эту информацию, объясните, каким образом SHMM все же был способен перемещать шарики вдоль актинового волокна.

и) Даже после расщепления цепи третичная структура «головки» S1 в SHMM оставалась неизменной. Объясните, каким образом белок может оставаться интактным и функционировать даже после того, как полипептидная цепь расщеплена и уже не является непрерывной.

Литература

Hynes, T.R., Block, S.M., White, B.T., & Spudich, J.A. (1987) Movement of myosin fragments in vitro: domains involved in force production. *Cell* 48, 953–963.

Модель могла бы выполняться, если молекулы субстрата и фермента находились хотя бы на немного большем расстоянии друг от друга, чем в ковалентной связи, но ближе, чем соседние, но несвязанные друг с другом (свободные) молекулы в растворе... В рамках фишерской модели ключа и замка, ключ не совсем подходит к замку, зато подвергается в нем некоторой деформации.

Дж. Б. С. Холдейн. Enzymes, 1930

Катализ формально может быть описан как стабилизация переходного состояния посредством тесного связывания с катализатором.

В. П. Дженкс. Статья в журнале Advances in Enzymology, 1975

Ферменты

6.1. Введение 270

6.2. Как работают ферменты 273

6.3. Ферментативная кинетика и методы изучения механизма действия ферментов 285

6.4. Примеры ферментативных реакций 300

6.5. Регуляторные ферменты 319

Для существования жизни необходимо выполнение двух основных условий. Во-первых, живой организм должен обладать способностью к самовоспроизведению (эту тему мы рассмотрим далее в части III). Во-вторых, организм должен уметь эффективно и селективно катализировать химические реакции. Осново-полагающая роль катализа, возможно, удивляет студентов, начинающих изучать биохимию, однако значение катализа очень просто продемонстрировать. Как говорилось в гл. 1, живая система использует энергию окружающей среды. Например, многие из нас в качестве источника энергии потребляют значительное количество сахарозы (столового сахара) либо в виде сладостей и напитков, либо в чистом виде. Превращение сахарозы в CO_2 и H_2O в присутствии кислорода — это экзергонический процесс, сопровождающийся высвобождением большого количества энергии,

которая позволяет нам думать, двигаться, ощущать вкус и видеть. (А пакет сахара на полке может храниться годами, не превращаясь в сколько-нибудь заметной степени в CO_2 и H_2O .) Этот химический процесс является благоприятным с термодинамической точки зрения, он протекает крайне медленно! Однако, попадая в организм человека (или любого другого живого существа), сахароза высвобождает запасенную в ней энергию за считанные секунды. Здесь и проявляется катализ. Без катализаторов такие химические реакции, как окисление глюкозы, не могли бы протекать со значительными скоростями, а следовательно, и поддерживать жизнь.

Таким образом, данную главу мы посвятим каталитическим реакциям в биологических системах и ферментам — самым удивительным и высокоспециализированным белкам. Ферменты обладают чрезвычайно высокой каталитической активностью, часто намного превышающей активность синтетических или неорганических катализаторов. Они проявляют высокую специфичность к субстратам, многократно ускоряют химические реакции и действуют в водных растворах в мягких условиях (температура и pH). Из небиологических катализаторов лишь немногие обладают подобными свойствами.

Фермент — ключевой участник любого биологического процесса. Действуя последовательно, ферменты катализируют сотни реакций, при-

водящих к расщеплению питательных веществ, получению и превращению химической энергии, а также к синтезу биологических макромолекул из простых предшественников.

Изучение ферментов имеет огромное практическое значение. Некоторые заболевания, особенно наследственные генетические нарушения, могут быть связаны с дефектом или полным отсутствием одного или нескольких ферментов. Причиной других заболеваний может быть слишком высокая активность фермента. Определение активности ферментов в плазме крови, эритроцитах или тканях играет важную роль в медицинской диагностике. Механизм действия многих лекарств включает их взаимодействие с ферментами в организме. Кроме того, ферменты находят практическое применение в химической и пищевой промышленности и в сельском хозяйстве.

Мы начнем с описания свойств ферментов и тех принципов, на которых базируется их каталитическое действие, а затем обратимся к ферментативной кинетике, без которой невозможно обсуждение активности ферментов. После этого мы обсудим механизмы действия некоторых ферментов, чтобы продемонстрировать основные биохимические принципы, и, наконец, остановимся на регуляции активности ферментов.

6.1. Введение

Значительная часть истории биохимии связана с исследованиями активности ферментов. Биологический катализ впервые был обнаружен и описан в конце 1700-х гг. при изучении процесса пере-

варивания мяса под действием желудочного сока; позднее, в XIX в., были проведены исследования, посвященные превращению крахмала в сахар под действием слюны и различных растительных экстрактов. В 1850 г. Луи Пастер пришел к выводу, что сбраживание сахара в спирт под действием дрожжей катализируется «энзимами» — ферментами. Он считал, что эти ферменты неотделимы от структур живой дрожжевой клетки. Подобная точка зрения, получившая название витализма, господствовала на протяжении нескольких десятилетий. Позднее, в 1887 г., Эдуард Бухнер показал, что превращение сахара в спирт может происходить под действием экстракта из дрожжей; это означало, что ферментацию осуществляют молекулы, продолжающие функционировать в бесклеточной системе. Эксперимент Бухнера положил конец виталистической теории — начался расцвет науки биохимии. Фредерик В. Кюне назвал молекулы, открытые Бухнером, **ферментами**.

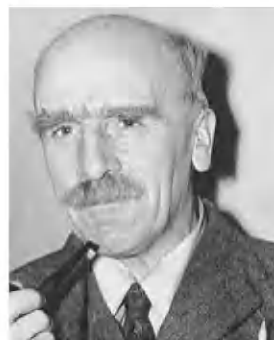
Важнейшим достижением раннего периода изучения ферментов стало выделение и получение кристаллического препарата уреазы, осуществленное Джеймсом Самнером в 1926 г. Обнаружив, что кристаллы уреазы полностью состоят из белка, Самнер высказал предположение, что все ферменты — белки. Других данных в то время не существовало, поэтому эта теория долгое время вызывала сомнения. Только после того, как в 1930-х гг. Джон Нортроп и Мозес Кунитц выделили пепсин, трипсин и другие пищеварительные ферменты, получили их кристаллические препараты и показали, что они также являются белками, теория Самнера была полностью признана. В этот же период был издан фундаментальный труд Дж. Б. С. Холдейна «Ферменты». Хотя



Эдуард Бухнер,
1860–1917



Джеймс Самнер,
1887–1955



Дж. Б. С. Холдейн,
1892–1964

молекулярная природа ферментов еще не была полностью ясна, Холдейн выдвинул замечательное предположение, что в основе каталитической реакции могут лежать слабые взаимодействия между ферментом и его субстратом. Эта теория является основным элементом наших сегодняшних представлений о ферментативном катализе.

Начиная со второй половины XX в. были выделены тысячи ферментов, структура и химический механизм действия многих из них теперь известны.

Большинство ферментов являются белками

За исключением немногочисленной группы молекул РНК, обладающих каталитической активностью (гл. 26), все остальные ферменты являются белками. Каталитическая активность ферментов зависит от степени сохранности их нативной конформации. При денатурации белка или его диссоциации на отдельные субъединицы ферментативная активность обычно исчезает. При разделении белка на отдельные составляющие его аминокислоты ферментативная активность всегда теряется. Таким образом, для функционирования фермента важно сохранение первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры белка.

Ферменты, как и другие белки, имеют молекулярные массы в диапазоне от 12 000 до 1 000 000 и более. Некоторым ферментам для проявления каталитической функции не нужны никакие химические группы, кроме собственной аминокислотной последовательности. Другие

Таблица 6-1		Некоторые ионы и атомы, являющиеся кофакторами ферментов
Ионы	Ферменты	
Cu^{2+}	Цитохромоксидаза	
Fe^{2+} или Fe^{3+}	Цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза	
K^+	Пируваткиназа	
Mg^{2+}	Гексокиназа, глюкозо-6-фосфатаза, пируваткиназа	
Mn^{2+}	Аргиназа, рибонуклеотидредуктаза	
Mo	Нитрогеназа	
Ni^{2+}	Уреаза	
Se	Глутатионпероксидаза	
Zn^{2+}	Карбоангидраза, алкогольдегидрогеназа, карбоксипептидазы А и В	

ферменты нуждаются в дополнительных химических компонентах — **кофакторах**. Кофакторами могут быть неорганические ионы, такие как Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} или Zn^{2+} (табл. 6-1), или сложные металлоорганические соединения, которые носят название **коферментов** (табл. 6-2). Некоторым ферментам для проявления активности необходим как кофактор, так и один или несколько ионов металла. Кофермент или ион металла, которые очень прочно (иногда посредством ковалентной связи) связаны с ферментом, называют **простетической группой**. Каталитически активный фермент со связанным коферментом и (или) ионами металла называется **холоферментом**.

Таблица 6-2			Некоторые коферменты, исполняющие роль промежуточных переносчиков атомов или функциональных групп
Кофермент	Пример переносимой группы или частицы	Предшественник в пище у млекопитающих	
Биоцитин	CO_2	Биотин	
Кофермент А	Ацильные группы	Пантотеновая кислота и др.	
5'-Дезоксиаденозилкобаламин (кофермент B_{12})	Атомы водорода и алкильные группы	Витамин B_{12}	
Флавинадениндинуклеотид	Электроны	Рибофлавин (витамин B_2)	
Липовая кислота	Электроны и ацильные группы	Не требуется в пище	
Никотинамидадениндинуклеотид	Гидрид-ионы (H^-)	Никотиновая кислота (ниацин)	
Пиридоксальфосфат	Аминогруппы	Пиридоксин (витамин B_6)	
Тетрагидрофолат	Одноуглеродные группы	Фолиевая кислота	
Тиаминпирофосфат	Альдегиды	Тиамин (витамин B_1)	

Примечание: структура и механизм действия этих коферментов обсуждаются в части II.

Белковая часть такого сложного фермента называется **апоферментом**, или **апопротеином**. Наконец, некоторые ферменты подвергаются ковалентной модификации при фосфорилировании, гликозилировании и т. д. Многие из этих процессов связаны с регуляцией ферментативной активности.

Ферменты классифицируют в соответствии с катализируемыми ими реакциями

Названия многих ферментов образовались в результате добавления суффикса «-аза» к названию их субстрата или к слову (фразе), описывающему суть их действия. Так, уреазы (от англ. *urea*) катализируют гидролиз мочевины, а ДНК-полимераза катализирует полимеризацию нуклеотидов с образованием нити ДНК. Некоторые другие ферменты были названы первооткрывателями в соответствии с какой-то особенностью их действия, прежде чем были обнаружены их специфические реакции. Например, фермент, участвующий в расщеплении пищи, был назван пепсином — от греч. *pepsis*, что означает «пищеварение»; лизоцим был назван так за свою способность лизировать клеточные стенки бактерий. Кроме того, существуют ферменты, название которых происходит от источника, из которого они были выделены: слово «трипсин» частично происходит от греч. *tryein*, что означает «стирать», поскольку он был получен при натирании панкреатической ткани глицерином. Иногда один и тот же фермент имеет несколько названий, а два разных фермента могут называться одинаково. Из-за этой путаницы с терминологией, а также в связи с возрастающим количеством вновь открываемых ферментов было принято междуна-

родное соглашение о создании системы единой номенклатуры и классификации ферментов. В соответствии с этой системой все ферменты в зависимости от катализируемых ими реакций делятся на шесть основных классов, каждый из которых включает в себя несколько подклассов (табл. 6-3). Каждому ферменту присвоен классификационный номер (код) из четырех цифр и систематическое название, отражающее суть катализируемой им реакции. Например, формальным систематическим названием для фермента, катализирующего реакцию



является АТФ: гексозо-6-фосфотрансфераза, что означает, что данный фермент катализирует перенос фосфорильной группы с АТФ на гексозу. Классификационный номер (*Enzyme Commission number*) этого фермента EC 2.7.1.1, в котором первая цифра 2 указывает класс фермента (трансфераза), вторая цифра 7 — подкласс (фосфотрансфераза), третья — 1 — подподкласс фосфотрансфераз, имеющих в качестве акцептора гидроксильную группу, последняя цифра 1 означает порядковый номер фермента в подподклассе (в данном случае эта цифра означает, что в качестве акцептора фосфорильной группы выступает D-гексоза). Для многих ферментов чаще используют тривиальные названия, в частности обсуждаемый фермент называется гексокиназой. Комитетом по номенклатуре Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme) составлен полный список и описание тысяч известных ферментов создаются. Данная глава посвящена в первую очередь общим принципам действия всех ферментов.

Таблица 6-3 Международная система классификации ферментов

№	Класс	Тип катализируемой реакции
1	Оксидоредуктазы	Перенос электронов (гидрид-ионов или атомов H)
2	Трансферазы	Перенос групп
3	Гидролазы	Реакции гидролиза (перенос молекулы воды на функциональные группы)
4	Лиазы	Присоединение групп по двойной связи или образование двойной связи путем удаления группы
5	Изомеразы	Перенос групп внутри молекулы с образованием изомерных форм
6	Лигазы	Образование связей C—C, C—S, C—O и C—N в реакциях конденсации, сопряженных с расщеплением АТФ

Краткое содержание раздела 6.1

ВВЕДЕНИЕ

- Жизнь зависит от мощных и специфических катализаторов — ферментов. Почти все биохимические реакции протекают с участием этих катализаторов.
- За исключением нескольких каталитических РНК, все известные ферменты являются белками. Многим из них для проявления каталитической активности требуется присутствие коферментов или кофакторов.
- Классификация ферментов основана на типе реакции, которую они катализируют. Всем ферментам присвоены ЕС-номера (ЕС от enzyme classification) и названия, а у многих ферментов есть также тривиальные названия.

6.2. Как работают ферменты

Ферментативный катализ играет важнейшую роль в живых системах. При стандартных физиологических условиях некатализируемые реакции идут крайне медленно, поскольку большинство биомолекул достаточно устойчивы при нейтральных значениях pH и температуре, при которой обычно существуют живые клетки. Более того, во многих биохимических реакциях происходят события, термодинамически довольно неблагоприятные или маловероятные для клетки, например временное образование неустойчивых промежуточных продуктов или столкновение двух или большего числа молекул в строго определенной ориентации. Реакции, необходимые для переваривания пищи, передачи нервного сигнала или мышечного сокращения, просто-напросто не могли бы протекать с ощутимыми скоростями, если бы не было катализаторов.

Фермент создает специфические условия, при которых данная реакция может идти быстрее. Отличительной особенностью ферментативной реакции является то, что она происходит внутри кармана на поверхности фермента, называемого **активным центром (рис. 6-1)**. Молекула, связывающаяся в активном центре и подвергающаяся воздействию фермента, называется **субстратом**. Поверхность активного центра об-

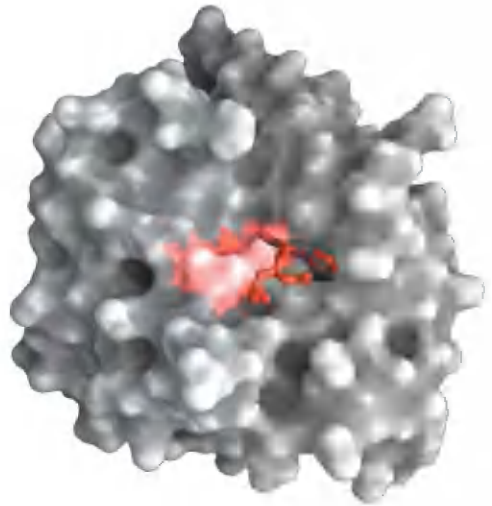


Рис. 6-1. Связывание субстрата в активном центре фермента. Здесь представлена модель химотрипсина (PDB ID 7GCH) со связанным субстратом (красного цвета). Некоторые ключевые аминокислоты активного центра изображены в виде красного пятна на поверхности фермента.

разована аминокислотными остатками, способными связывать субстрат и катализировать его химическое превращение. Часто в результате связывания субстрат скрывается в активном центре фермента и полностью отделяется от остального раствора. Образование комплекса фермента с субстратом, существование которого впервые предсказал Шарль-Адольф Вюрц в 1880 г., — ключевая стадия ферментативного катализа. Кроме того, образование фермент-субстратного комплекса принято за начальную точку при проведении кинетических расчетов для ферментативных реакций, а также на этом основаны теоретические представления, касающиеся механизмов ферментативного катализа.

Ферменты влияют на скорость реакции, но не сдвигают равновесие

Простая ферментативная реакция в общем виде записывается следующим образом:



где E, S и P — фермент, субстрат и продукт реакции соответственно; ES и EP — промежуточные комплексы фермента с субстратом и фермента с продуктом.

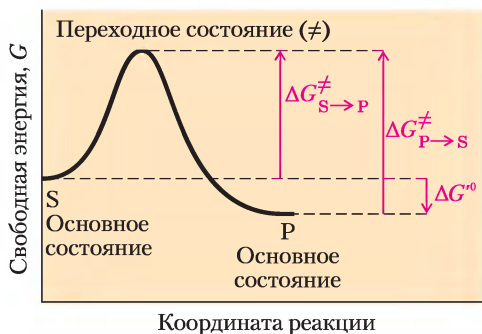


Рис. 6-2. Энергетическая диаграмма химической реакции. График описывает изменение свободной энергии системы в течение реакции $S \rightarrow P$. В диаграммах подобного рода по оси ординат откладывают энергию системы, а по оси абсцисс — координату реакции, отражающую последовательные изменения в системе по мере превращения S в P (например, образование и разрыв связей). На графике показаны значения энергии активации (ΔG^\ddagger) для реакций $S \rightarrow P$ и $P \rightarrow S$. ΔG° — стандартная свободная энергия реакции $S \rightarrow P$.

Чтобы говорить дальше о катализе, нам следует четко разобраться в понятиях «равновесие реакции» и «скорость реакции». Функция катализатора состоит в увеличении скорости реакции, но он не может влиять на *равновесие* ускоряемой им реакции. Любую реакцию, например $S \rightleftharpoons P$, можно описать с помощью энергетической диаграммы — графика изменения энергии вдоль координаты реакции (рис. 6-2). Как обсуждалось в гл. 1, биологические системы характеризуются величиной свободной энергии (G). Итак, ход реакции можно изобразить с помощью зависимости свободной энергии системы от координаты реакции. Начальные точки прямой и обратной реакций называются **основным состоянием** и определяют вклад молекулы S или P в свободную энергию системы в конкретных условиях.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Для описания изменений свободной энергии необходимо задать стандартные условия: температура 298 К, парциальное давление любого газа 1 атм (101,3 кПа), концентрации всех растворенных веществ 1 М; изменения свободной энергии для данной реакции системы в ходе реакции следует записать как изменение стандартной свободной энергии (ΔG°). Поскольку биохимические про-

цессы обычно протекают при концентрации H^+ значительно ниже 1 М, в биохимии используют **изменение стандартной биохимической свободной энергии ($\Delta G'^\circ$)**, что соответствует ΔG° при рН 7,0. Далее мы будем пользоваться именно этим параметром. Более полное определение $\Delta G'^\circ$ приводится в гл. 13. ■

Положение равновесия между S и P зависит от разности значений свободной энергии основных состояний этих веществ. В примере, изображенном на рис. 6-2, свободная энергия вещества P в основном состоянии ниже, чем вещества S , поэтому для данной реакции $\Delta G'^\circ < 0$ — равновесие сдвинуто в сторону образования P (реакция протекает слева направо). Положение равновесия реакции *не зависит* от наличия катализатора.

Благоприятные термодинамические параметры, однако, не означают, что превращение S в P протекает с измеримой скоростью. *Скорость* реакции зависит совсем от других величин. Вспомним, что на пути перехода от S к P существует энергетический барьер, поскольку для протекания реакции в любом направлении необходимо затратить энергию на правильную ориентацию реакционных групп, образование неустойчивого комплекса, перегруппировку связей в молекулах и другие преобразования. На рис. 6-2 и 6-3 это отражено в виде пика свободной энергии. Чтобы реакция могла протекать, молекулы должны обладать достаточной энергией для преодоления этого барьера. На вершине энергетического пика существует точка, в которой вероятность протекания реакции в обоих направлениях одинакова. Эта точка соответствует **переходному состоянию**. Переходное состояние — это некоторая неопределенная стабильная химическая структура; его не следует путать с промежуточными продуктами реакции (ES и EP). Переходное состояние существует короткое время, на протяжении которого происходит разрушение связей, образование связей и локализация заряда, причем в этот момент одинаково вероятно образование исходного вещества и продукта реакции. Разность между значениями энергии в основном и переходном состояниях называется **энергией активации (ΔG^\ddagger)**. Скорость реакции связана с энергией активации: чем выше энергия активации, тем медленнее протекает реакция. Увеличить скорость реакции можно,

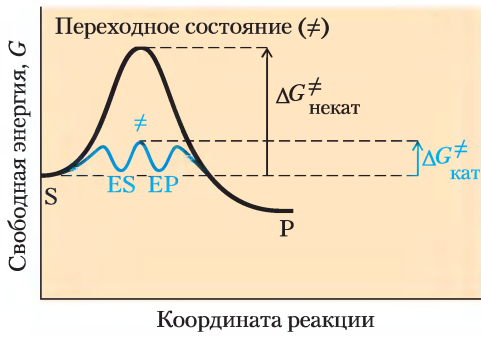


Рис. 6-3. Энергетическая диаграмма реакции в присутствии катализатора и без него. В реакции $S \rightarrow P$ промежуточные соединения ES и EP занимают энергетические минимумы, образуемые в процессе катализируемой ферментом реакции. Энергии активации некатализируемой и катализируемой реакций обозначены соответственно $\Delta G_{\text{некат}}^{\ddagger}$ и $\Delta G_{\text{кат}}^{\ddagger}$. Видно, что в случае ферментативной реакции энергия активации ниже.

подняв температуру, поскольку при этом возрастает количество молекул, обладающих достаточной энергией для преодоления энергетического барьера. Другой способ ускорить реакцию состоит в добавлении катализатора (**рис. 6-3**). Катализатор ускоряет реакцию путем снижения энергии активации.

Ферменты, как и любые другие катализаторы, не сдвигают равновесие реакции. Знак обратимости \rightleftharpoons в уравнении 6-1 подчеркивает этот принцип: фермент, катализирующий реакцию $S \rightarrow P$, также катализирует и реакцию $P \rightarrow S$. Роль фермента заключается в *ускорении* прямой и обратной реакций. Сам фермент при этом не расходуется, и равновесие реакции не сдвигается. Но в присутствии соответствующего фермента реакция достигает равновесия гораздо быстрее, поскольку скорость реакции возрастает.

Этот общий принцип можно проиллюстрировать на примере взаимодействия сахарозы с кислородом с образованием углекислого газа и воды:



Это превращение, протекающее в несколько стадий, характеризуется большим по абсолютной величине отрицательным значением ΔG° , поэтому в состоянии равновесия количество сахарозы в реакционной смеси незначительно. Тем не менее сахароза является устойчивым соединением, поскольку энергетический барьер, который нужно преодолеть для взаимодействия сахарозы с кис-

лородом, достаточно высокий. В присутствии кислорода сахароза хранится бесконечно долго, не подвергаясь заметным превращениям. Однако в клетках сахароза быстро распадается на CO_2 и H_2O в результате серии ферментативных реакций. Участвующие в этих реакциях ферменты не только ускоряют их, но также организуют и контролируют таким образом, что большая часть высвобождаемой в результате реакций энергии извлекается в другой химической форме и может быть использована в клетке для других целей. Расщепление сахарозы и других сахаров является для клетки основным источником энергии; с участием ферментов соответствующие реакции протекают с такой скоростью, чтобы удовлетворить потребности клетки в энергии.

Практически все реакции имеют несколько промежуточных стадий, на которых происходит образование и распад весьма недолговечных химических соединений, называемых промежуточными соединениями или **интермедиатами*** реакции. Интермедиаты образуются в ходе реакции и имеют ограниченное время жизни (более длительное, чем время колебания молекулы, равное $\sim 10^{-13}$ с). Если реакция $S \rightleftharpoons P$ катализируется ферментом, то интермедиатами данного процесса могут быть комплексы ES и EP, несмотря на то что S и P являются устойчивыми химическими молекулами (см. уравнение 6-1). Комплексам ES и EP отвечают минимумы на энергетической диаграмме (рис. 6-3). Кроме того, в ферментативной реакции могут возникать и менее устойчивые интермедиаты. Взаимное превращение двух последовательных интермедиатов составляет одну стадию реакции. Если реакция протекает в несколько стадий, ее общая скорость определяется скоростью той стадии (или тех стадий), которая имеет максимальную энергию активации; эту стадию называют **скоростьлимитирующей стадией**. В простейшем случае скоростьлимитирующая

* В данной главе понятия «стадия» и «интермедиат» относятся к химическим соединениям, образующимся с участием одного фермента. При обсуждении метаболических путей, в которых задействовано множество ферментов (см. часть II), эти термины используют несколько иначе. Одну ферментативную реакцию часто называют стадией метаболического пути, а продукт ферментативной реакции, являющийся субстратом для следующей реакции, называют интермедиатом.

стадия соответствует максимуму на энергетической диаграмме взаимопревращений S и P. Какая стадия скоростью лимитирующая, зависит от условий реакции. Для многих ферментов сразу несколько стадий могут иметь одинаковые энергии активации, что означает, что все они лимитируют скорость суммарного процесса.

Энергия активации — это и есть энергетический барьер химической реакции. Наличие таких барьеров играет чрезвычайно важную роль в живых организмах. Скорость, с которой молекула претерпевает определенные изменения, снижается при повышении энергии активации. Без подобных энергетических барьеров сложные макромолекулы самопроизвольно превращались бы в более простые молекулярные формы, и существование сложных высокоорганизованных структур, а также протекание метаболических процессов в клетке не представлялось бы возможным. В ходе эволюции возникли ферменты, способные *избирательно* понижать энергии активации тех реакций, которые необходимы клетке.

Скорость реакции и равновесие связаны с определенными термодинамическими параметрами

Равновесие реакции неразрывно связано со стандартной свободной энергией реакции ($\Delta G'^{\circ}$), а скорость реакции — с энергией активации (ΔG^*). Для дальнейшего изучения принципов ферментативного катализа необходимо подробнее остановиться на этих термодинамических параметрах.

Равновесие $S \rightleftharpoons P$ описывается **константой равновесия** K'_{eq} (или просто K ; с. 90). В стандартных условиях, принятых для биологических систем, константа равновесия K'_{eq} (или K') определяется как:

$$K'_{\text{eq}} = \frac{[P]}{[S]} \quad (6-2)$$

Из термодинамики мы уже знаем, что K'_{eq} и $\Delta G'^{\circ}$ связаны следующим соотношением:

$$\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K' \quad (6-3)$$

где $R = 8,315 \text{ Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})$ — универсальная газовая постоянная, $T = 298 \text{ К}$, что соответствует 25°C . Уравнение 6-3 выводится и подробно

Таблица 6-4 Соотношение между K' и $\Delta G'^{\circ}$	
K'_{eq}	$\Delta G'^{\circ}$ (кДж/моль)
10^{-6}	34,2
10^{-5}	28,5
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,1
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0,0
10^1	-5,7
10^2	-11,4
10^3	-17,1

Примечание: рассчитано по уравнению $\Delta G'^{\circ} = -RT \ln K'_{\text{eq}}$ (6-3).

обсуждается в гл. 13. Сейчас важно понять, что константа равновесия связана со стандартной свободной энергией реакции (табл. 6-4). Большое по абсолютной величине отрицательное значение $\Delta G'^{\circ}$ означает, что равновесие реакции сдвинуто в сторону образования продуктов реакции, но, как уже говорилось выше, это не означает, что реакция может протекать с высокой скоростью.

Скорость любой реакции определяется концентрациями реагирующих веществ и **константой скорости** (k). Скорость (v) мономолекулярной реакции $S \rightarrow P$ представляет собой количество вещества S, реагирующего в единицу времени, и определяется **уравнением скорости**:

$$v = k [S] \quad (6-4)$$

Скорость этой реакции зависит только от концентрации S. Это так называемая реакция первого порядка. Множитель k — константа, отражающая вероятность протекания реакции при данных условиях (рН, температура и т. д.). В данном случае k является константой скорости реакции первого порядка и измеряется в единицах, обратных времени, например с^{-1} . Пусть для первого порядка константа скорости $k = 0,03 \text{ с}^{-1}$, это значит, что за 1 с 3% доступного вещества S превращается в вещество P. Реакция с $k = 2000 \text{ с}^{-1}$ завершится за долю секунды.

Если скорость реакции определяется концентрациями двух различных веществ, т. е. реак-

ция протекает между двумя веществами, то такая реакция имеет второй порядок, поэтому k — константа скорости реакции второго порядка, измеряется в л · моль⁻¹ · с⁻¹. Уравнение скорости реакции имеет следующий вид:

$$v = k [S_1][S_2] \quad (6-5)$$

Из теории переходного состояния следует, что значение константы скорости связано с энергией активации следующим уравнением:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (6-6)$$

где k_B — постоянная Больцмана, h — постоянная Планка. Здесь важно обратить внимание на то, что константа скорости реакции k связана с энергией активации (ΔG^\ddagger). В упрощенном виде это уравнение означает, что снижение энергии активации приводит к росту скорости реакции.

Теперь перейдем от вопроса, *что* делают ферменты, к вопросу, *как* они это делают.

Некоторые принципы, объясняющие высокую каталитическую активность и специфичность ферментов

Ферменты являются чрезвычайно мощными катализаторами. Они повышают скорости процессов на 5–17 порядков (табл. 6-5). Кроме того, ферменты действуют очень специфично, легко отличая свой субстрат от довольно близких по структуре соединений. Как объяснить такие большие скорости процессов при такой высокой селективности? Какой источник энергии позволяет так сильно снизить энергию активации той или иной реакции?

Таблица 6-5 Увеличение скорости химических реакций в присутствии ферментов

Циклофилин	10 ⁵
Карбоангидраза	10 ⁷
Триозофосфатизомераза	10 ⁹
Карбоксипептидаза А	10 ¹¹
Фосфоглюкомутаза	10 ¹²
Сукцинил-СоА-трансфераза	10 ¹³
Уреаза	10 ¹⁴
Оротидилатдекарбоксилаза	10 ¹⁷

Попробуем ответить на эти вопросы. В-первых, ферментативная реакция сопряжена с перестройками ковалентных связей. Между субстратом и функциональными группами фермента (боковыми цепями аминокислотных остатков, ионами металла, коферментами) происходят химические реакции самого разного типа. Функциональные группы фермента могут образовывать кратковременные ковалентные связи с субстратом и активировать его для химического превращения; функциональная группа может быть перенесена с субстрата на фермент. Во многих случаях эти превращения происходят исключительно в активном центре фермента. Ковалентные взаимодействия между ферментом и субстратом ускоряют реакцию, поскольку проводят ее по другому пути, характеризующемуся более низкой энергией активации. Специфические типы изменений, происходящих в реагирующих молекулах, описаны в разд. 6.4.

Во-вторых, между ферментом и субстратом существуют и *нековалентные* взаимодействия. Эти слабые взаимодействия в значительной степени являются источником энергии, которая требуется для снижения энергии активации. Именно образование специфического комплекса ES отличает ферменты от всех прочих катализаторов. Связь фермента с субстратом в этом комплексе осуществляется при помощи тех же сил, которые стабилизируют структуру белка, а именно водородных связей, гидрофобных и ионных взаимодействий (гл. 4). Каждое слабое взаимодействие в комплексе ES сопровождается высвобождением небольшого количества энергии, обеспечивающей устойчивость этого взаимодействия. Энергия взаимодействия фермента с субстратом носит название **энергии связывания** (ΔG_B). Она обеспечивает не только стабилизацию фермент-субстратного комплекса. *Энергия связывания является основным источником свободной энергии, позволяющей снизить энергию активации ферментативной реакции.*

Каким образом ферменты используют энергию нековалентного взаимодействия, объясняют два основополагающих и взаимосвязанных принципа.

1. Каталитическая активность ферментов обусловлена выделением свободной энергии при образовании множества слабых связей

между ферментом и его субстратом. Это и есть энергия связывания, от которой зависят как специфичность, так и скорость процесса.

- Слабые взаимодействия наиболее благоприятны при прохождении реакции через переходное состояние; активный центр фермента комплементарен не самому субстрату, а тем переходным состояниям, через которые проходит субстрат в процессе своего превращения в продукт реакции.

Эти принципы очень важны для понимания сути ферментативного катализа, поэтому мы остановимся на них подробнее.

Слабые взаимодействия фермента с субстратом особенно благоприятны в переходном состоянии

Как удастся ферменту использовать энергию связывания для снижения энергии активации? Само по себе образование фермент-субстратного комплекса не дает ответа на этот вопрос, хотя ранние теории о механизмах действия ферментов строились именно на существовании этого комплекса. Изучение специфичности ферментов позволило Эмилю Фишеру в 1894 г. выдвинуть гипотезу о структурной комплементарности ферментов и их субстратов, благодаря которой они подходят друг к другу, как ключ и замок (рис. 6-4). Эта элегантная идея, утверждающая, что специфическое взаимодействие между двумя биологическими молекулами связано с комплементарностью форм их поверхностей, значительно повлияла на развитие биохимии. Выяснилось, что подобные взаимодействия лежат в основе многих биологических процессов. Однако в приложении к ферментативному катализу модель «ключа и замка» может ввести в заблуждение. Мы сейчас продемонстрируем, что фермент, который абсолютно комплементарен своему субстрату, является очень плохим катализатором.

Рассмотрим гипотетический процесс. Пусть надо сломать намагниченный металлический стержень. Именно этот неферментативный процесс изображен на рис. 6-5, а. Давайте представим себе, что есть два фермента, которые способны катализировать процесс разламывания стержня пополам, причем каждый из них исполь-

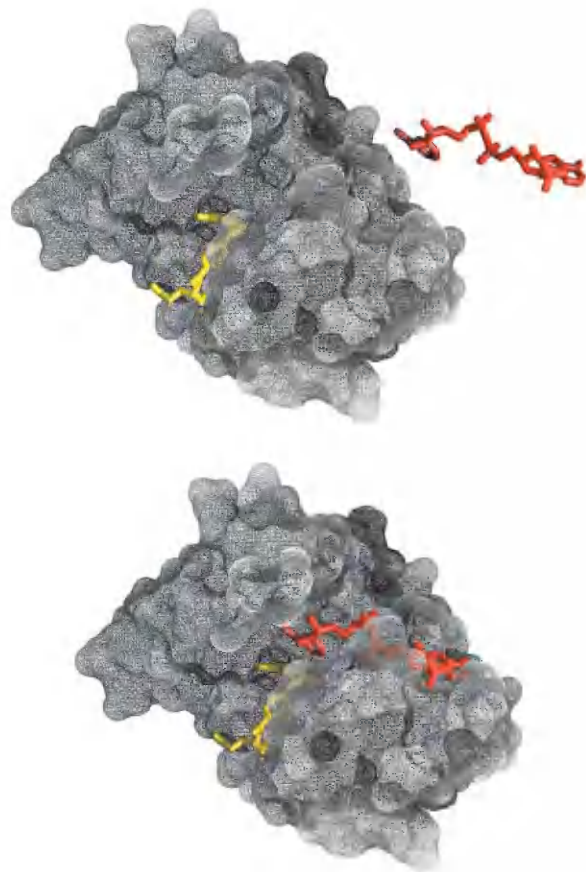


Рис. 6-4. Комплементарность субстрата и его центра связывания на молекуле фермента. Фермент диглюкозилредуктаза и ее субстрат NADP⁺ (выделен красным цветом) в свободной (наверху) и связанной формах (внизу). Еще один связанный субстрат тетрагидрофолат изображен желтым цветом (PDB ID 1RA2). NADP⁺ связывается в кармане фермента, который комплементарен ему по форме и ионным свойствам. В действительности, как было показано в гл. 5, комплементарность белка и лиганда (в данном случае субстрата) редко бывает идеальной. Взаимодействие белка с лигандом часто сопровождается конформационными изменениями одной или обеих молекул (так называемое индуцированное соответствие). Отсутствие полной комплементарности фермента и субстрата играет важную роль в ферментативном катализе (на данном рисунке этого не видно).

зует магнитные силы в качестве аналога энергии связывания, используемой реальными ферментами. Сначала представим себе фермент, абсолютно комплементарный субстрату (рис. 6-5, б). Активный центр этого фермента — некий карман, выстланный магнитными частицами. Для того чтобы стержень сломался, он должен

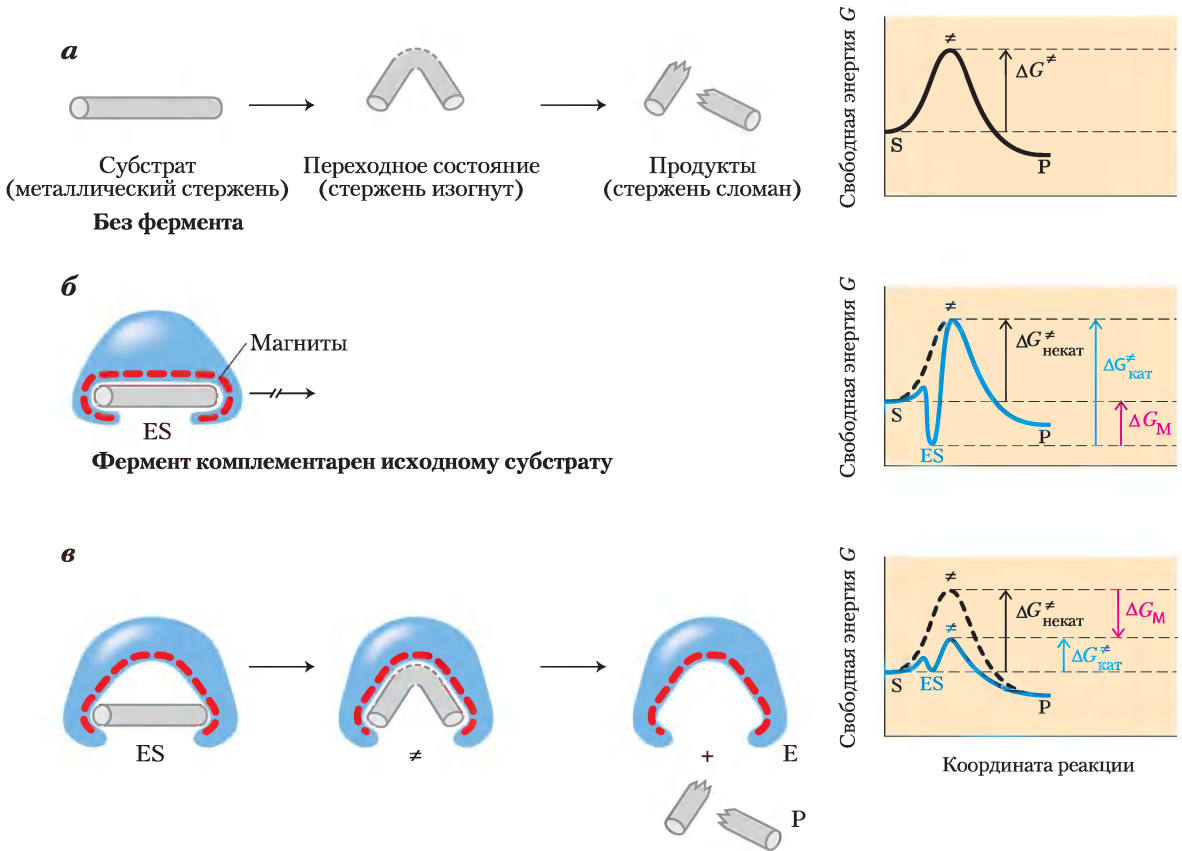


Рис. 6-5. Гипотетический фермент, катализирующий разламывание металлического стержня.

а) Прежде чем стержень сломается, он должен изогнуться (достичь переходного состояния). В случае двух гипотетических ферментов роль слабых взаимодействий между ферментом и субстратом играют магнитные взаимодействия. **б)** Фермент с высланными магнитными частицами карманом, комплементарным по форме железному стержню (субстрату), стабилизирует исходное состояние субстрата. Изгибу стержня мешают многочисленные магнитные взаимодействия с ферментом. **в)** Фермент, активный центр которого комплементарен переходному состоянию, помогает дестабилизировать стержень и тем самым катализирует его разламывание. Энергия связывания (магнитные взаимодействия) компенсирует рост свободной энергии, необходимой для сгибания стержня. На энергетических диаграммах (справа) видна разница в изменении энергии при комплементарности фермента исходному субстрату и его переходному состоянию (комплекс EP не рассматривается). Разность энергий переходных состояний катализируемой и некатализируемой реакций (ΔG_M^\ddagger) обусловлена магнитными взаимодействиями между стержнем и ферментом. В том случае, когда фермент комплементарен субстрату (**б**), комплекс ES более устойчив и характеризуется более низкой свободной энергией в основном состоянии, чем сам субстрат. Это приводит к увеличению энергии активации.

достичь переходного состояния, но он настолько плотно прилегает к активному центру, что не может изогнуться, поскольку изгиб приведет к исчезновению магнитных взаимодействий между стержнем и ферментом. Такой фермент *мешает* протеканию реакции, так как стабилизирует

субстрат в неактивном состоянии. Энергетическая диаграмма этой реакции (рис. 6-5, **б**) характеризуется наличием глубокого энергетического минимума при образовании комплекса ES, из которого субстрат вряд ли сможет выйти. Подобный фермент абсолютно бесполезен.

Современные представления о ферментативном катализе впервые были сформулированы Майклом Полани (1921 г.) и Джоном Холдейном (1930 г.), а затем развиты в работе Лайнуса Полинга (1946 г.). В соответствии с теорией, для эффективного катализа фермент должен быть комплементарен *переходному состоянию реакции*. Это означает, что оптимальное взаимодействие между ферментом и субстратом достигается только в переходном состоянии. На рис. 6-5, в изображен гипотетический фермент, действующий по такому принципу. Металлический стержень связывается с ферментом, но при этом реализуется только часть возможных взаимодействий. Связанный субстрат должен претерпевать дальнейшие изменения, сопровождающиеся повышением свободной энергии. Но в данном случае повышение свободной энергии, необходимое для изгиба стержня и принятия им почти изломанной конформации, возмещается за счет магнитных взаимодействий (энергии связывания) между ферментом и субстратом в переходном состоянии. Многие из этих взаимодействий происходят на участках, находящихся на значительном расстоянии от места изгиба. Эти взаимодействия между ферментом и не участвующими в реакции частями стержня обеспечивают часть энергии для его разламывания. Такое «возмещение» энергии соответствует пе-

реходу к состоянию с более низкой энергией активации и к ускорению реакции.

Реальные ферменты действуют по аналогичному принципу. Некоторые слабые взаимодействия существуют в фермент-субстратном комплексе, а наиболее полно эти взаимодействия реализуются, только когда субстрат достигает переходного состояния. Свободная энергия (энергия связывания), высвобождаемая при образовании этих слабых связей, частично возмещает энергию, необходимую для достижения вершины энергетического пика. Если суммировать неблагоприятный вклад энергии активации ($\Delta G^* > 0$) и благоприятный вклад энергии связывания ($\Delta G_B < 0$), получим *снижение* энергии активации (рис. 6-6). Даже в случае ферментативной реакции в переходном состоянии устойчивого химического соединения не образуется; переходное состояние существует лишь короткий промежуток времени, когда субстрат находится в точке, соответствующей энергетическому максимуму. Следовательно, ферментативная реакция протекает гораздо быстрее неферментативной, поскольку ее энергетический барьер гораздо ниже. Именно слабое взаимодействие между ферментом и субстратом является движущей силой ферментативного катализа. Функциональные группы субстрата, участвующие в этих слабых взаимодействиях, могут находиться на отдаленных расстояниях от связей, которые должны разрываться или изменяться. Основной вклад в катализ вносят те слабые взаимодействия, которые возникают только в переходном состоянии.

Необходимость множества слабых взаимодействий является одной из причин, почему ферменты (и некоторые коферменты) имеют такие большие размеры. Фермент должен иметь функциональные группы для ионных, водородных связей и т. д., причем эти группы должны быть определенным образом расположены, чтобы энергия связывания была оптимальной именно в переходном состоянии. Правильное связывание обычно достигается, если субстрат, попадая в полость в молекуле фермента (в активный центр), не контактирует с водой. Размеры белков позволяют сохранять такую структуру, в которой действующие группы расположены оптимальным образом, а активный центр поддерживается в определенном состоянии.

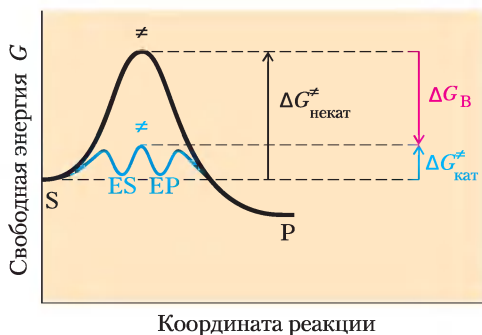


Рис. 6-6. Роль энергии связывания в катализе. Чтобы снизить энергию активации реакции, система должна получить энергию, эквивалентную снижению ΔG^* . В основном энергия поступает от связывания (энергия связывания G_B^*) в результате слабых нековалентных взаимодействий между ферментом и субстратом в переходном состоянии. Роль G_B^* в данном случае аналогична роли ΔG_M на рис. 6-5.

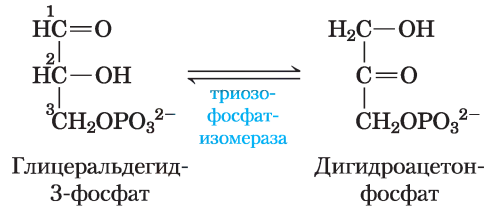
Энергия связывания определяет специфичность и скорость катализа

Можно ли количественно показать, что при участии фермента энергия связывания приводит к большому ускорению реакции? Да, можно. По уравнению 6-6 можно рассчитать, что в нормальных для клетки условиях для ускорения реакции первого порядка в 10 раз значение ΔG^* должно уменьшиться примерно на 5,7 кДж/моль. Выигрыш в энергии при образовании одной слабой связи обычно составляет 4–30 кДж/моль. Таким образом, суммарной энергии, накапливающейся в результате нескольких подобных взаимодействий, вполне достаточно для снижения энергии активации на 60–100 кДж/моль, что и объясняет чрезвычайно эффективное ускорение реакций под действием ферментов.

Та же энергия связывания, что обеспечивает энергию для катализа, определяет и **специфичность** фермента, т. е. его способность отличать субстрат от других молекул. Интуитивно специфичность легко отличить от катализа (ускорения реакции), гораздо труднее различить их в эксперименте, поскольку катализ и специфичность являются двумя сторонами одного и того же явления. Если активный центр фермента имеет функциональные группы, расположенные таким образом, чтобы оптимально обеспечивать слабые взаимодействия с молекулой конкретного субстрата в переходном состоянии, то этот фермент не сможет с такой же эффективностью реагировать с другой молекулой. Например, если в молекуле субстрата есть гидроксильная группа, способная образовывать водородную связь с конкретным остатком глутаминовой кислоты (Glu) в молекуле фермента, то любая молекула, не имеющая гидроксильной группы в этом положении, будет плохим субстратом для данного фермента. Кроме того, любая молекула с функциональной группой, для которой у фермента нет места в центре связывания, по всей вероятности, не будет образовывать необходимого комплекса с ферментом. В общем случае *специфичность* обусловлена образованием множества слабых связей между ферментом и его субстратом.

Значение энергии связывания для катализа легко продемонстрировать. Например, глико-

литический фермент триозофосфатизомераза катализирует взаимные превращения глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата:



В данной реакции меняются местами карбонильная и гидроксильная группы у атомов углерода 1 и 2. Однако выяснилось, что ускорение этой ферментативной реакции более чем на 80% связано с фермент-субстратными взаимодействиями, затрагивающими фосфатную группу у атома углерода 3 в молекуле субстрата. Это удалось обнаружить при сравнении ферментативных реакций, в которых в качестве субстрата использовали глицеральдегид-3-фосфат и глицеральдегид, не имеющий фосфатной группы в положении 3.

Описанные выше принципы можно проиллюстрировать на примерах известных механизмов катализа. Заметим, что различные механизмы катализа вовсе не исключают друг друга, а конкретный фермент может осуществлять процессы с несколькими типами катализа.

От чего же зависит возможность протекания ферментативной реакции? От физических и термодинамических факторов, которые определяют прежде всего энергетический барьер реакции (ΔG^*), а именно: 1) изменение энтропии при взаимодействии молекул в растворе (самопроизвольно протекают процессы с увеличением энтропии, а с уменьшением энтропии — процессы, при которых подводится энергия); 2) наличие сольватной оболочки из связанных водородными связями молекул воды вокруг большинства макромолекул стабилизирует их состояние в водных биосредах; 3) во многих реакциях происходит деформация молекул субстрата; 4) функциональные группы в ферменте должны быть определенным образом организованы.

Во-первых, очевидным положительным результатом связывания двух реагирующих частиц — субстрата и фермента является зна-

чительное ограничение их подвижности, выражающееся в **снижении энтропии**. Энергия связывания удерживает субстраты в ориентации, необходимой для протекания реакции, что вносит ощутимый вклад в катализ, поскольку продуктивные столкновения молекул в растворе чрезвычайно редки. Субстраты таким образом размещаются на молекуле фермента, чтобы множество слабых взаимодействий между ними и стратегическими группами фермента удерживало молекулы субстратов в необходимом положении. Исследования показали, что ограничение подвижности двух реагирующих веществ увеличивает скорость реакции на несколько порядков (рис. 6-7).

Во-вторых, образование слабых связей между субстратом и ферментом приводит к **разрушению сольватной оболочки** вокруг субстрата. Связи фермента с субстратом замещают большинство водородных связей между субстратом и водой.

В-третьих, энергия связывания, являющаяся результатом слабых взаимодействий, возникающих исключительно в переходном состоянии, помогает компенсировать потери от любого искажения молекулы, в первую очередь от перераспределения электронов, которому субстрат должен подвергнуться в реакции.

И наконец, *в-четвертых*, при связывании субстрата сам фермент обычно претерпевает конформационные изменения благодаря образованию множества слабых связей. Данный процесс называют **индуцированным соответствием**, механизм которого был предложен Д. Кошландом в 1958 г. Эти изменения могут затрагивать небольшие области молекулы фермента вблизи активного центра или целые домены. Обычно в молекуле фермента происходит серия связанных между собой перемещений, которые в конечном итоге приводят к необходимым изменениям состояния активного центра. Индуцированное соответствие приводит к той ориентации функциональных групп фермента, которая необходима для осуществления катализа. Конформационные изменения также способствуют образованию в переходном состоянии дополнительных слабых связей. В любом случае новая конформация фермента имеет улучшенные каталитические свойства. Раньше мы уже показали, что индуцированное соответ-

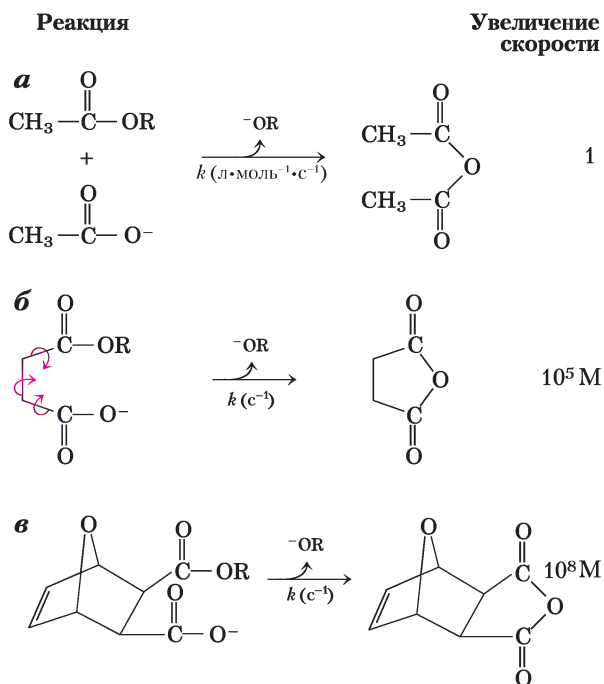


Рис. 6-7. Увеличение скорости реакции и уменьшение энтропии. Здесь показана реакция между сложным эфиром и карбоксильной группой, приводящая к образованию ангидрида. В каждом случае R-группа одна и та же. *а*) Данная бимолекулярная реакция описывается константой скорости реакции второго порядка, измеряемой в $л \cdot моль^{-1} \cdot с^{-1}$. *б*) Если обе реагирующие группы находятся в одной молекуле, реакция протекает гораздо быстрее. Константа k этой мономолекулярной реакции измеряется в $с^{-1}$. Разделив значение константы скорости реакции (*б*) на константу скорости реакции (*а*), получим, что скорость увеличилась $\sim 10^5$ М раз (увеличение скорости имеет размерность, поскольку мы сравнили мономолекулярную и бимолекулярную реакции). Иными словами, если реагирующее вещество в реакции (*б*) находится в концентрации 1 М, то реакция проходит так, как будто концентрация реагирующих групп составляет 10^5 М. Заметьте, что реагирующая молекула в реакции (*б*) имеет свободу вращения вокруг трех связей (показаны стрелками); тем не менее в этом случае наблюдается значительное снижение энтропии по сравнению с реакцией (*а*). В случае (*в*) все те связи, что допускали вращение в случае (*б*), жестко фиксированы. В результате энтропия еще больше снижается, а реакция по сравнению со случаем (*а*) ускоряется в 10^8 раз.

ствие лежит в основе обратимого связывания белков с лигандами (гл. 5); оно также играет важную роль во взаимодействии практически любого фермента с его субстратом.

Роль специфических каталитических групп в катализе

Для большинства ферментов энергия связывания, используемая для образования комплекса ES, является лишь частью той движущей силы, которая способствует катализу. Как только субстрат связывается с ферментом, определенным образом расположенные функциональные группы помогают расщеплять и образовывать связи, действуя в соответствии с различными механизмами, в том числе по механизму общего кислотно-основного катализа, ковалентного катализа и катализа ионами металлов. Эти механизмы отличны от тех,

что используют энергию связывания, поскольку в данном случае происходит кратковременное образование *ковалентных* связей с субстратом или перенос группы от субстрата или на него.

Общий кислотно-основной катализ. Многие биохимические реакции проходят через стадию образования неустойчивых заряженных интермедиатов, которые быстро распадаются на исходные соединения и тем самым препятствуют протеканию реакции (рис. 6-8). Заряженные интермедиаты часто можно стабилизировать путем переноса протонов от субстрата (интермедиата) или на него, в результате чего образуется соединение,

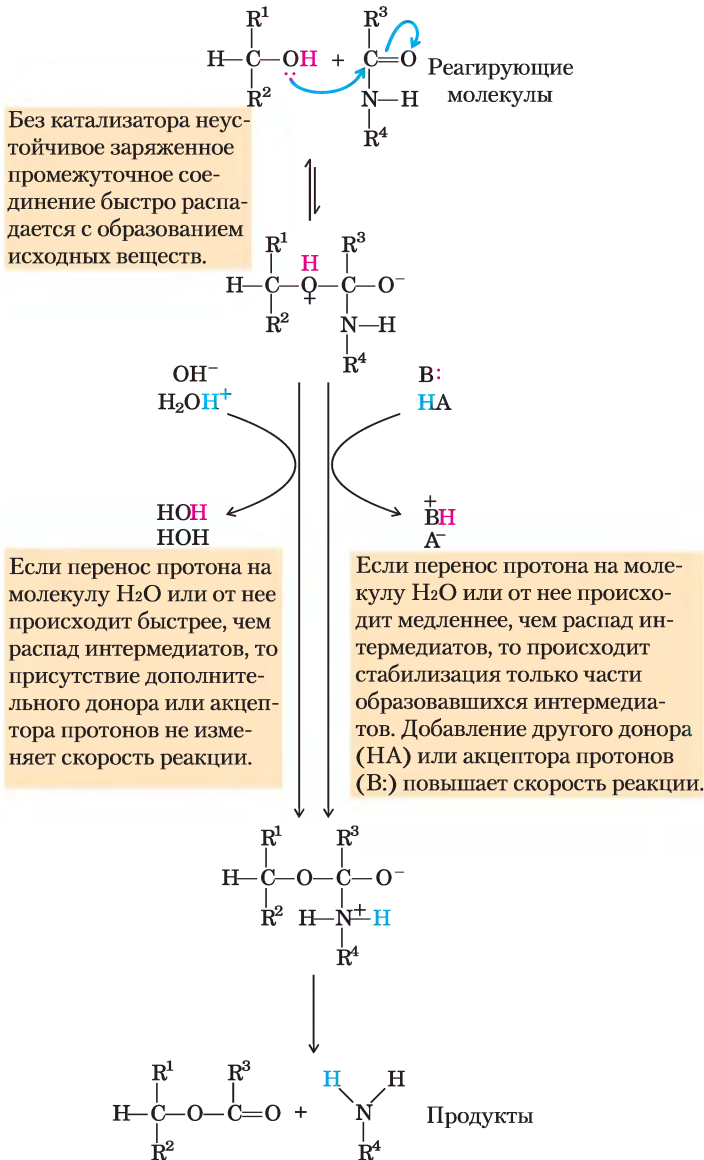


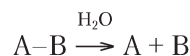
Рис. 6-8. Преодоление неблагоприятного образования заряда в процессе расщепления амидной связи. Реакция, аналогичная изображенному здесь гидролизу амидной связи, происходит при катализе химотрипсином и другими протеазами. Образование заряда является неблагоприятным фактором, и он должен быть компенсирован путем присоединения протона от H_3O^+ (специфический кислотный катализ) или любой кислоты НА (общий кислотный катализ). Кроме того, заряд может быть нейтрализован переносом протона на OH^- (специфический основной катализ) или основанием В (общий основной катализ).

которое легче распадается с образованием продуктов реакции. В неферментативных реакциях в переносе протона участвуют либо только компоненты молекулы воды, либо другие слабые доноры и акцепторы протонов. Катализ такого типа, который использует исключительно H^+ (H_3O^+) или OH^- , присутствующие в воде, называется **специфическим кислотно-основным катализом**. Если перенос протонов между интермедиатом и водой происходит быстрее, чем интермедиат распадается на исходные вещества, интермедиат эффективно стабилизируется сразу после образования. Никакого дополнительного катализа посредством других доноров или акцепторов протонов не происходит. Однако во многих случаях участия воды недостаточно. **Общим кислотно-основным катализом** называют перенос протонов, осуществляемый другими классами молекул. В неферментативных реакциях в водных растворах этот тип катализа наблюдается в том случае, если неустойчивый интермедиат распадается на исходные вещества быстрее, чем происходит перенос протона на молекулу воды или от

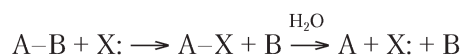
нее. В данной ситуации многие слабые органические кислоты могут служить дополнительными донорами протонов, а слабые органические основания — акцепторами протонов.

Аналогичным образом, в активном центре фермента боковые цепи ряда аминокислотных остатков могут играть роль доноров и акцепторов протонов (**рис. 6-9**). В активном центре фермента эти группы располагаются определенным образом, чтобы осуществлять перенос протона, и обеспечивают увеличение скорости реакции в 10^2 – 10^5 раз. В соответствии с этим механизмом катализа действует большинство ферментов. Перенос протона относится к ряду наиболее распространенных биохимических реакций.

Ковалентный катализ. При ковалентном катализе между ферментом и субстратом временно образуется ковалентная связь. Рассмотрим реакцию гидролиза связи между группами А и В:



В присутствии ковалентного катализатора (фермента с нуклеофильной группой X:) реакция приобретает следующий вид:



Таким образом, путь реакции меняется, и катализ осуществляется, *только* если энергия активации нового пути ниже, чем энергия активации некаталитической реакции. Обе стадии нового процесса должны протекать быстрее, чем реакция без катализатора. В качестве нуклеофильных групп, участвующих в образовании ковалентных связей с субстратом, могут выступать боковые цепи некоторых аминокислотных остатков, например те, что показаны на рис. 6-9, а также некоторые кофакторы. После образования ковалентного комплекса обязательно происходит реакция, в результате которой высвобождается свободный фермент. Ковалентные связи между ферментом и субстратом могут специфическим образом активировать субстрат для последующих реакций.

Катализ ионами металлов. Металлы, как прочно связанные с ферментом, так и захваты-

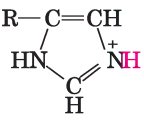
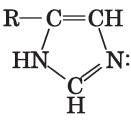
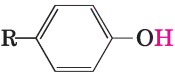
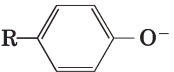
Аминокислотный остаток	Кислота (донор протона)	Основание (акцептор протона)
Glu, Asp	$R-COOH$	$R-COO^-$
Lys, Arg	$R-\overset{+}{N}H_2$	$R-\ddot{N}H_2$
Cys	$R-SH$	$R-S^-$
His		
Ser	$R-OH$	$R-O^-$
Tyr		

Рис. 6-9. Аминокислоты, участвующие в общем кислотно-основном катализе. Многие органические реакции протекают при участии доноров протонов (кислот) или акцепторов протонов (оснований). Активные центры некоторых ферментов содержат функциональные группы аминокислот, в частности перечисленные здесь, которые могут принимать участие в процессе катализа в качестве доноров или акцепторов протонов.

ваемые из раствора вместе с субстратом, могут участвовать в катализе несколькими способами. Ионные взаимодействия между субстратом и связанным с ферментом металлом помогают ориентировать субстрат определенным образом или стабилизировать заряженную молекулу субстрата в переходном состоянии. Подобные слабые взаимодействия металла с субстратом напоминают некоторые способы использования энергии связывания фермента с субстратом, описанные ранее. Кроме того, металлы могут участвовать в окислительно-восстановительных реакциях, обратимо изменяя свою степень окисления. Около трети известных на сегодняшний день ферментов для проявления каталитической активности нуждаются в присутствии одного или нескольких ионов металлов.

Большинство ферментов совмещают несколько стратегий катализа. Хорошим примером одновременного использования ковалентного, общего кислотного-основного катализа и стабилизации в переходном состоянии может служить реакция, катализируемая химотрипсином, которая более подробно рассматривается в разд. 6.4.

Краткое содержание раздела 6.2 КАК РАБОТАЮТ ФЕРМЕНТЫ

- Ферменты — это исключительно активные катализаторы, ускоряющие реакции, как правило, в 10^5 – 10^{17} раз.
- Ферментативные реакции характеризуются образованием фермент-субстратного комплекса (ES). Связывание субстрата происходит в полости молекулы фермента, называемой активным центром.
- Суть действия ферментов и других катализаторов заключается в снижении энергии активации (ΔG^*), в результате чего увеличивается скорость реакции. Катализатор не смещает равновесия реакции.
- Значительная доля энергии, идущей на повышение скорости реакции, возникает за счет слабых взаимодействий (водородные связи, гидрофобные и ионные взаимодей-

ствия) между ферментом и субстратом. Активный центр фермента устроен таким образом, что некоторые из этих слабых взаимодействий реализуются только в переходном состоянии и стабилизируют его. Необходимость множества слабых связей является одной из причин, объясняющих большие размеры молекул ферментов. Энергия связывания фермента с субстратом (ΔG_B) используется для снижения энтропии субстрата или осуществления конформационных изменений в молекуле фермента (индуцированное соответствие). Энергия связывания, кроме того, вносит вклад в специфичность ферментов к их субстратам.

- К дополнительным каталитическим механизмам с участием ферментов относятся общий кислотно-основной катализ, ковалентный катализ и катализ ионами металлов. Ферменты часто образуют временные ковалентные связи с субстратами или осуществляют перенос определенных групп, в результате чего возникает новый путь реакции с более низкой энергией активации.

6.3. Ферментативная кинетика и методы изучения механизма действия ферментов

Существует несколько методов изучения механизмов действия ферментов. Знание трехмерной структуры белка снабжает исследователей очень важной информацией, ценность которой еще более возрастает при использовании подходов классической белковой химии и современных методов сайт-направленного мутагенеза (направленного изменения аминокислотной последовательности белка генно-инженерным путем, рис. 9-11). Данные технологии позволяют биохимикам изучать роль отдельных аминокислот в структуре и функциях фермента. Однако основной подход к изучению механизма ферментативной реакции заключается в определении *скорости* реакции и ее изменений в ответ на изменение внешних параметров, т. е. для этого изучают **ферментативную кинетику** реакции. Этот самый старый способ исследова-

ния механизма ферментативной реакции остается наиболее важным. Рассмотрим основные закономерности ферментативной кинетики. Цитируемые в конце главы источники позволят более подробно изучить данный предмет.

Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата

Для скорости ферментативной реакции определяющим фактором является концентрация субстрата $[S]$. Изучение влияния концентрации субстрата затрудняется тем, что эта концентрация меняется в ходе реакции *in vitro* по мере того, как субстрат превращается в продукт реакции. Для того чтобы обойти эту проблему в основу экспериментальной кинетики ферментативных реакций положено определение **начальной скорости v_0** (рис. 6-10). В типичной реакции фермент присутствует в наномолярной концентрации, тогда как концентрация субстрата на пять или шесть порядков выше. В начальный момент реакции (часто не более 60 с) концентрация

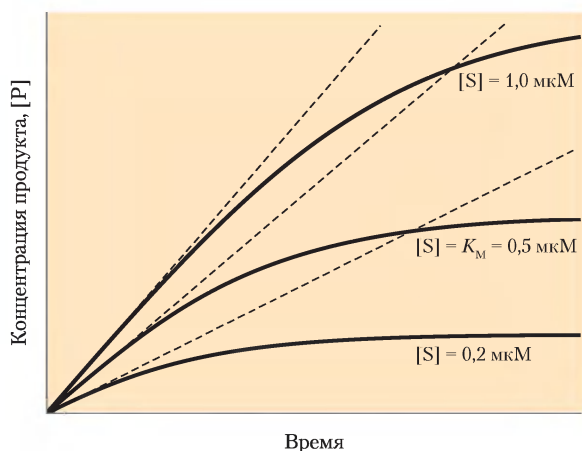


Рис. 6-10. Определение начальной скорости ферментативных реакций. Реакцию $S \rightleftharpoons P$ катализирует гипотетический фермент, присутствующий в концентрации, достаточной для достижения максимальной скорости накопления продукта $V_{\max} = 1$ М/мин. Константа Михаэлиса (см. текст) $K_M = 0,5$ мкМ. На графике представлены кривые для реакций при разных концентрациях субстрата: $[S] < K_M$, $[S] = K_M$, $[S] > K_M$. Скорость ферментативной реакции снижается по мере превращения субстрата в продукт. Для каждой кривой тангенс угла наклона касательной при $t = 0$ дает начальную скорость v_0 .

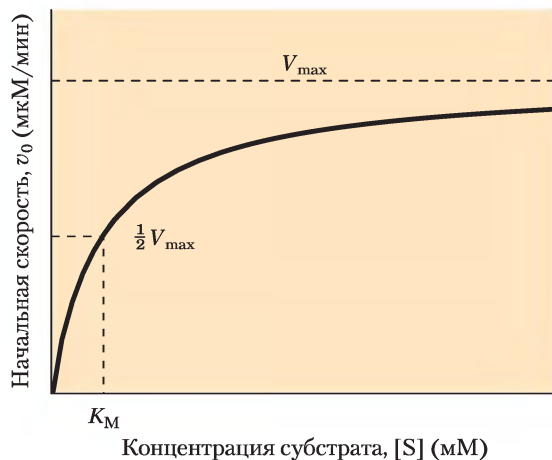


Рис. 6-11. Влияние концентрации субстрата на начальную скорость ферментативной реакции. Максимальную скорость V_{\max} можно определить из данного графика только путем экстраполяции, поскольку V_{\max} никогда не достигается. Концентрация субстрата, при которой v_0 равна половине максимальной скорости, называется константой Михаэлиса (K_M). Концентрация фермента в этих экспериментах обычно мала, так что $[S] \gg [E]$, даже если субстрат присутствует в невысокой концентрации.

субстрата изменяется не более чем на несколько процентов, так что $[S]$ считают постоянной величиной. В таком случае можно представить v_0 как функцию от концентраций субстрата, которые выбирает и добавляет сам исследователь. Влияние $[S]$ на v_0 при постоянной концентрации фермента продемонстрировано на рис. 6-11. При сравнительно низких концентрациях субстрата v_0 растет почти линейно с ростом $[S]$. При более высоких значениях $[S]$ рост v_0 замедляется. В пределе увеличение $[S]$ приводит лишь к пренебрежимо малому увеличению v_0 , т. е. начальная скорость реакции приближается к **максимальной скорости (V_{\max})**.

Для понимания подобного кинетического поведения системы необходимо учитывать образование фермент-субстратного комплекса ES . На основании зависимости, представленной на рис. 6-11, в 1903 г. Виктор Анри, продолжавший работы Вюрца, предположил, что необходимой стадией ферментативной реакции является взаимодействие фермента с субстратом, приводящее к образованию комплекса ES . Эта идея была развита в общей теории ферментативного



Леонор Михаэлис,
1875–1949



Мод Ментен, 1879–1960

катализа, сформулированной в 1913 г. Леонором Михаэлисом и Мод Ментен. В данной теории постулируется, что сначала происходит быстрая обратимая реакция образования фермент-субстратного комплекса:



Затем комплекс ES с меньшей скоростью распадается на свободный фермент и продукт реакции P:



Поскольку более медленная вторая реакция лимитирует общую скорость процесса, общая скорость должна быть пропорциональна концентрации веществ, реагирующих на этой стадии, т. е. [ES].

В любой момент времени в ходе ферментативной реакции фермент присутствует в двух формах — как свободный фермент E и как фермент-субстратный комплекс ES. При низкой концентрации субстрата S фермент в основном находится в свободной форме E. При этом скорость реакции пропорциональна [S] и равновесие, описываемое уравнением 6-7, при высокой концентрации субстрата [S] сминуто в сторону образования ES. Максимальная скорость ферментативной реакции (V_{\max}) достигается, когда практически весь фермент связан в комплексе ES, а концентрация свободного фермента пренебрежимо мала. При этом фермент «насыщается» своим субстратом, так что дальнейшее увеличение [S] не влияет на скорость реакции. Данное состояние системы наблюдается, когда [S] до-

статочно велико и весь свободный фермент переводится в форму ES. В результате распада комплекса ES происходит образование продукта P и высвобождение свободного фермента, готового катализировать превращение следующей молекулы субстрата. Эффект насыщения является отличительной особенностью ферментативного катализа; именно насыщением объясняется наличие плато на рис. 6-11. Тип зависимости, изображенный на рис. 6-11, иногда называют кинетикой насыщения.

При смешивании фермента с избытком субстрата наблюдается так называемое **предстационарное состояние**, в котором происходит рост концентрации комплекса ES. Этот период обычно слишком краток (несколько микросекунд), так что его нелегко зафиксировать в условиях эксперимента, и он не виден на рис. 6-10. Реакция быстро переходит в **стационарное состояние**, при котором концентрация ES (и любых других интермедиатов) практически не меняется со временем. Концепция стационарного состояния была предложена Г. Э. Бриггсом и Дж. Б. С. Холдейном в 1925 г. Измеряемое значение v_0 обычно соответствует стационарному состоянию, даже если определяется на ранних этапах реакции, поэтому метод анализа начальных скоростей называется **стационарной кинетикой**.

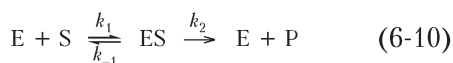
Количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью реакции

Для большинства ферментов зависимость v_0 от [S] (рис. 6-11) имеет один и тот же вид (стремится к равнобочной гиперболе) и выражается уравнением Михаэлиса–Ментен. Михаэлис и Ментен вывели свое уравнение, опираясь все на тот же постулат, что лимитирующая стадия ферментативной реакции — это распад комплекса ES с образованием продукта и высвобождением фермента. Уравнение выглядит следующим образом:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (6-9)$$

Параметры [S], v_0 и V_{\max} , а также константа Михаэлиса (K_M) являются важными характеристиками реакции и могут быть определены экспериментально.

Теперь рассмотрим подробнее основные логические и алгебраические этапы вывода уравнения Михаэлиса–Ментен с учетом приближений стационарной кинетики, введенных Бриггсом и Холдейном. Для вывода уравнения запишем две основные схемы реакций, соответствующие образованию и распаду комплекса ES (уравнения 6-7 и 6-8). В начальный момент концентрация продукта [P] ничтожно мала, что позволяет пренебречь скоростью обратной реакции $P \rightarrow S$ (константа скорости k_{-2}). Это предположение не критично, но сильно упрощает нашу задачу. В результате общее уравнение реакции примет следующий вид:



Скорость v_0 определяется распадом комплекса ES и зависит от [ES]:

$$v_0 = k_2[ES] \quad (6-11)$$

Поскольку [ES] сложно определить экспериментально, следует выразить этот параметр каким-то другим образом. Прежде всего, введем параметр $[E_t]$, отражающий общую концентрацию фермента (сумму концентраций связанного в комплекс ES и свободного фермента). Тогда концентрацию свободного фермента можно определить как $[E_t] - [ES]$. Аналогично, поскольку обычно $[S] \gg [E_t]$, то в любой момент времени количество субстрата, связанного в комплекс с ферментом, пренебрежимо мало по сравнению с общей концентрацией S. Помня об этом, выразим v_0 через определяемые в эксперименте параметры.

1. Скорости образования и распада комплекса ES определяются стадиями процесса с константами k_1 (образование) и $k_{-1} + k_2$ (распад):

$$\text{Скорость образования ES} = k_1([E_t] - [ES])[S] \quad (6-12)$$

$$\text{Скорость распада ES} = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (6-13)$$

2. Теперь нам предстоит сделать важное допущение: начальная скорость реакции соответствует стационарному состоянию, при котором концентрация ES постоянна, т. е. скорость образования ES равна скорости его распада:

$$k_1([E_t] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (6-14)$$

3. Теперь перейдем к решению уравнения (6-14) относительно [ES]. Сначала раскроем скобки в левой части уравнения и вынесем за скобки [ES] в правой части:

$$k_1[E_t][S] - k_1[ES][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (6-15)$$

Прибавив к обеим частям уравнения $k_1[ES][S]$ и упростив, получим:

$$k_1[E_t][S] = (k_1[S] + k_{-1} + k_2)[ES] \quad (6-16)$$

Отсюда найдем [ES]:

$$[ES] = \frac{k_1[E_t][S]}{k_1[S] + k_{-1} + k_2} \quad (6-17)$$

Это выражение можно упростить, объединив все константы:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{[S] + (k_{-1} + k_2)/k_1} \quad (6-18)$$

Выражение $(k_{-1} + k_2) / k_1$ называют **константой Михаэлиса** и обозначают K_M . Подставляя K_M в уравнение 6-18, получаем

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_M + [S]} \quad (6-19)$$

4. Теперь можно выразить скорость v_0 через [ES]. Подставляя правую часть уравнения 6-19 вместо [ES] в уравнении 6-11, получаем:

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (6-20)$$

Эту формулу можно упростить. Поскольку при насыщении фермента (т. е. при $[ES] = [E_t]$) достигается максимальная скорость реакции, то V_{\max} можно определить как $k_2[E_t]$. Подставляя это в уравнение 6-20, получаем уравнение 6-9:

$$v_0 = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

Это и есть **уравнение Михаэлиса–Ментен**, т. е. **уравнение скорости** односубстратной ферментативной реакции. Оно выражает количественное соотношение между начальной скоростью реакции v_0 , максимальной скоростью V_{\max} и исходной концентрацией субстрата [S], которые связаны между собой через константу Михаэлиса K_M . Заметьте, что константа Михаэлиса имеет размерность концентрации. Соответствует ли данное уравнение экспериментальным наблюдениям? Да, соответствует, и это можно показать,

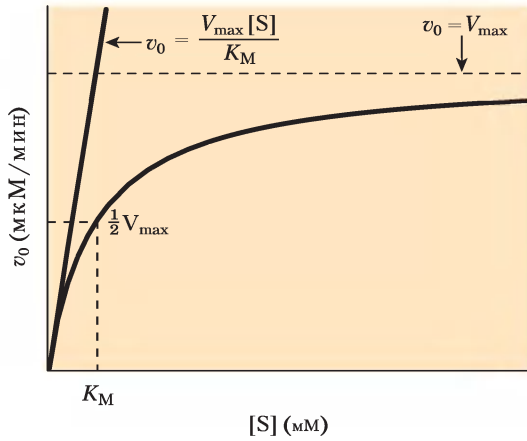


Рис. 6-12. Зависимость начальной скорости от концентрации субстрата. На графике отражены кинетические параметры, ограничивающие данную кривую при высоких и низких значениях $[S]$. При низких концентрациях субстрата $K_M \gg [S]$, и в знаменателе уравнения 6-9 концентрацией субстрата $[S]$ можно пренебречь. Тогда $v_0 = V_{\max} [S] / K_M$, т. е. v_0 линейно зависит от $[S]$, как и следует из рисунка. При высоких концентрациях субстрата $[S] K_M \ll [S]$, и в знаменателе уравнения 6-9 можно пренебречь константой Михаэлиса K_M . Тогда $v_0 = V_{\max}$. Это состояние соответствует плато на графике при высоких значениях $[S]$. Таким образом, уравнение Михаэлиса–Ментен согласуется с экспериментальной зависимостью v_0 от $[S]$, а форма кривой ограничена тангенсом угла наклона касательной V_{\max} / K_M при низких концентрациях субстрата и значением V_{\max} при высоких концентрациях субстрата.

Дополнение 6–1 Преобразование уравнения Михаэлиса–Ментен: график в двойных обратных координатах

Уравнение Михаэлиса–Ментен

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

можно преобразовать алгебраическим способом в другую форму, более удобную для анализа экспериментальных данных. Одно из наиболее часто используемых преобразований состоит в том, что уравнение представляют в обратных величинах:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{\max} [S]}$$

Запишем отношение справа в виде суммы:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{[S]}{V_{\max} [S]}$$

и в результате упрощения приходим следующему:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{\max} [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Данная форма записи уравнения Михаэлиса–Ментен называется **уравнением Лайнуивера–Берка**. Для ферментов, подчиняющихся кинетике Михаэлиса–Ментен, график зависимости $1/v_0$ от $1/[S]$ (в двойных обратных координатах) представляет собой прямую (рис. 1). Угол наклона прямой равен K_M / V_{\max} ; точка пересечения прямой с осью ординат $1/V_{\max}$, а точка пересечения с осью абсцисс $-1/K_M$. График в двойных обратных координатах, называемый также графиком Лайнуивера–Берка, позволяет более точно определить максимальную скорость V_{\max} , которую в обычных координа-

тах v_0 от $[S]$ можно оценить лишь *приблизительно* (см. рис. 6-12).

Существуют и другие способы преобразования уравнения Михаэлиса–Ментен, причем каждый из них имеет определенные преимущества для анализа экспериментальных данных (см. задачу 14 в конце данной главы).

Графики в двойных обратных координатах исключительно полезны для выявления различий в механизмах ферментативного катализа (см. рис. 6-14) и анализа ингибирования ферментативных реакций (доп. 6-2).

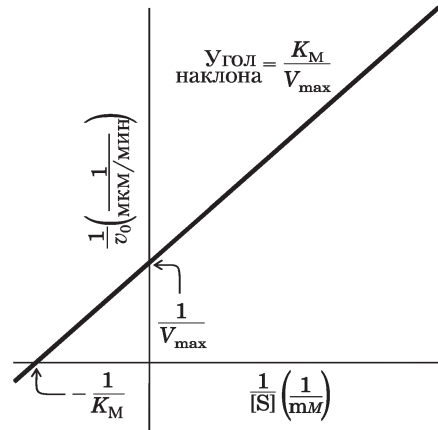


Рис. 1. График в двойных обратных координатах (график Лайнуивера–Берка).

рассматривая граничные условия, когда [S] принимает очень большие или очень малые значения (рис. 6-12).

Важное численное соотношение, вытекающее из уравнения Михаэлиса–Ментен, наблюдается в частном случае, когда начальная скорость равна половине максимальной скорости (рис. 6-12):

$$\frac{V_{\max}}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (6-21)$$

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

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (6-22)$$

Решив это уравнение относительно K_M , получим $K_M + [S] = 2[S]$ или

$$K_M = [S], \text{ когда } v_0 = \frac{1}{2} V_{\max} \quad (6-23)$$

Это определение K_M очень важно для практического использования: константа Михаэлиса соответствует концентрации субстрата, при которой начальная скорость реакции равна половине максимальной скорости.

Уравнение Михаэлиса–Ментен (уравнение 6-9) алгебраическим путем можно преобразовать к виду, удобному для практического определения K_M и V_{\max} (доп. 6-1), а также для анализа действия ингибиторов (доп. 6-2 на с. 296).

Использование кинетических параметров для сравнения активностей ферментов

Важно понимать различие между уравнением Михаэлиса–Ментен и тем частным кинетическим механизмом, для которого оно исходно было получено. Данное уравнение описывает кинетическое поведение огромного большинства ферментов, и про все ферменты с гиперболической зависимостью v_0 от [S] говорят, что они подчиняются кинетике Михаэлиса–Ментен. Практическое правило, что $K_M = [S]$ при $v_0 = 1/2 V_{\max}$ (уравнение 6-23), соблюдается для всех ферментов, подчиняющихся кинетике Михаэлиса–Ментен. Важное исключение — регуляторные ферменты, которые не подчиняются этой кинетике (разд. 6.5). Однако уравнение Михаэлиса–Ментен хорошо описывает не только сравнительно простой двухстадийный

механизм ферментативной реакции, предложенный Михаэлисом и Ментен (уравнение 6-10). Многие ферменты, подчиняющиеся кинетике Михаэлиса–Ментен, имеют совсем другой механизм действия, например ферменты могут катализировать реакции, протекающие в 6–8 стадий. Хотя уравнение 6-23 справедливо для многих ферментов, порядок реакций и величины констант K_M , а также V_{\max} для разных ферментов различны. В этом заключается важное ограничение использования условий стационарности для анализа ферментативной кинетики. Для данного фермента значения K_M и V_{\max} можно определить экспериментальным путем, однако сами по себе они почти ничего не говорят о количестве стадий реакции, их скорости и химической природе. Тем не менее анализ данных стационарной кинетики позволяет определять каталитическую активность ферментов и сравнивать их между собой.

Интерпретация значений K_M и V_{\max} . На рис. 6-12 изображен простой графический метод, позволяющий оценивать значение K_M . Более точные значения можно получить, используя **метод двойных обратных координат** (доп. 6-1). Численные значения K_M для конкретных ферментов могут очень сильно различаться; более того, могут различаться значения K_M для субстратов одного и того же фермента (табл. 6-6). Константа Михаэлиса иногда (и часто неоправданно) используется как показатель сродства фермента к субстрату. А значение K_M зависит от таких аспектов механизма реакции, как количество и относительные скорости отдельных стадий. Для двухстадийной реакции

$$K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (6-24)$$

Если лимитирующей является вторая стадия реакции, то $k_2 \ll k_{-1}$, и формула 6-24 упрощается: $K_M = k_{-1}/k_1$, что соответствует **константе диссоциации** комплекса ES (K_d). В этом случае K_M действительно является мерой сродства фермента к субстрату в комплексе ES. Однако такая ситуация наблюдается далеко не всегда. Иногда $k_2 \gg k_{-1}$, при этом $K_M = k_2/k_1$. В других случаях k_{-1} и k_2 сравнимы по порядку величины, и K_M зависит от всех трех констант (уравнение 6-24). В подобных ситуациях урав-

Таблица 6-6 Значения K_M для нескольких ферментов

Фермент	Субстрат	K_M (мМ)
Гексокиназа (из мозга)	АТР	0,4
	D-Глюкоза	0,05
	D-Фруктоза	1,5
Карбоангидраза	HCO_3^-	26
Химотрипсин	Глицил-тирозинил-глицин	108
	N-бензоил-тирозинамид	2,5
β -Галактозидаза	D-лактоза	4,0
Треониндегидратаза	L-треонин	5,0

нение Михаэлиса–Ментен по-прежнему применимо, наблюдается характерная зависимость с насыщением, но только K_M нельзя рассматривать в качестве меры сродства фермента к субстрату. Еще более часто наблюдаются ситуации, при которых после образования комплекса ES реакция протекает в несколько стадий — K_M оказывается сложной функцией нескольких констант.

Значения V_{\max} также сильно различаются для разных ферментов. Если фермент действует в соответствии с двухстадийным механизмом Михаэлиса–Ментен, то $V_{\max} = k_2[E_t]$, где k_2 — константа скорости лимитирующей стадии. Однако число стадий реакции и лимитирующая стадия могут изменяться от фермента к ферменту. Рассмотрим, например, довольно распространенную ситуацию, когда лимитирующей стадии соответствует образование продукта, т. е. реакция $EP \rightarrow E + P$. В начале реакции, когда концентрация продукта [P] мала, суммарная реакция может быть описана следующей схемой:



В данном случае большая часть фермента при насыщении находится в форме EP и $V_{\max} = k_3[E_t]$. Для скорости лимитирующей стадии ферментативной реакции с насыщением полезно ввести константу скорости k_{cat} . Если реакция протекает в несколько стадий, одна из которых определено лимитирующая, то k_{cat} равна константе скорости лимитирующей стадии. Для простого слу-

чая, описываемого уравнением 6-10, $k_{\text{cat}} = k_2$. Для реакции, описываемой уравнением 6-25, $k_{\text{cat}} = k_3$. Если несколько стадий реакции являются лимитирующими, k_{cat} представлена сложной функцией нескольких констант скорости. Подставим в уравнении Михаэлиса–Ментен (уравнение 6-9) $k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E_t]$:

$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}}[E_t][S]}{K_M + [S]} \quad (6-26)$$

Если скорость лимитирующая стадия — реакция первого порядка, константа k_{cat} имеет размерность обратного времени. Иначе эту константу называют **числом оборотов** ферментативной реакции — число молекул субстрата, превращенных в продукт в единицу времени на одной молекуле фермента при условии насыщения фермента субстратом. Число оборотов некоторых ферментов представлено в табл. 6-7.

Сравнение каталитических механизмов и эффективности действия ферментов. Константы k_{cat} и K_M используют при изучении и сравнении различных ферментов независимо от сложности механизма реакции. Значения k_{cat} и K_M каждого фермента отражают условия клеточной среды, концентрацию субстрата в реакциях *in vivo*, а также химический механизм катализируемой реакции.

Кроме того, величины k_{cat} и K_M позволяют оценить каталитическую эффективность фермента, но знания лишь одной из этих констант недостаточно. Два фермента, катализирующие разные реакции, могут характеризоваться одинаковыми значениями k_{cat} , хотя скорости тех

Таблица 6-7 Число оборотов (k_{cat}) некоторых ферментов

Фермент	Субстрат	k_{cat} (с ⁻¹)
Каталаза	H_2O_2	40 000 000
Карбоангидраза	HCO_3^-	400 000
Ацетилхолин-эстераза	Ацетилхолин	14 000
β -Лактамаза	Бензилпенициллин	2000
Фумараза	Фумарат	800
Белок RecA (АТРаза)	АТР	0,5

же реакций без катализатора различаются, следовательно, различается и степень ускорения реакций под действием ферментов. Обычно величина K_M фермента близка к его концентрации субстрата в клетке. Фермент, субстрат которого содержится в клетке в очень низкой концентрации, обычно характеризуется более низким значением K_M , чем фермент, субстрат которого присутствует в более высокой концентрации.

Наилучший способ сравнения каталитической активности разных ферментов или воздействия одного и того же фермента на различные субстраты состоит в сопоставлении отношений k_{cat} / K_M для исследуемых реакций. Это отношение иногда называют **коэффициентом специфичности**; это константа скорости превращения $E + S \rightarrow E + P$. При $[S] \ll K_M$ уравнение 6-26 преобразуется к виду

$$v_0 = \frac{k_{cat}}{K_M} [E_t][S] \quad (6-27)$$

В данном случае v_0 зависит от концентраций двух реагирующих веществ $[E_t]$ и $[S]$; следовательно, кинетическое уравнение 6-27 описывает реакцию второго порядка с константой скорости k_{cat} / K_M , размерность которой $M^{-1}c^{-1}$. Скорость реакции ограничена скоростью диффузии E и S в водном растворе. В пределе $k_{cat} / K_M \sim 10^8 - 10^9 M^{-1}c^{-1}$; для многих ферментов k_{cat} / K_M находится в этом диапазоне (табл. 6-8). Про такие ферменты говорят, что они достигли «каталитического совершенства». Заметьте, что отношение k_{cat} / K_M может иметь максимальное значение при самых разных значениях k_{cat} и K_M .

Пример 6-1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ МИХАЭЛИСА K_M

Был исследован фермент, катализирующий следующую химическую реакцию:



Исследователи назвали фермент «веселазой». Они обнаружили, что для этого фермента k_{cat} составляет $600 c^{-1}$. Было решено поставить несколько экспериментов.

При $[E_t] = 20 \text{ нМ}$ и $[\text{ГРУСТЬ}] = 40 \text{ мкМ}$ начальная скорость реакции $v_0 = 9,6 \text{ мкМ} \cdot c^{-1}$. Найдите K_M для субстрата ГРУСТЬ.

Решение. Известны значения k_{cat} , $[E_t]$, $[S]$ и v_0 . Нужно определить K_M . Лучше всего применить уравнение 6–26, а вместо максимальной скорости V_{max} подставить $k_{cat} [E_t]$. Подставляя известные нам величины, получаем значение K_M .

$$v_0 = \frac{k_{cat} [E_t][S]}{K_M + [S]}$$

$$9,6 \text{ мкМ} \cdot c^{-1} = \frac{(600 c^{-1})(0,020 \text{ мкМ})(40 \text{ мкМ})}{K_M + 40 \text{ мкМ}}$$

$$9,6 \text{ мкМ} \cdot c^{-1} = \frac{480 \text{ мкМ}^2 \cdot c^{-1}}{K_M + 40 \text{ мкМ}}$$

$$9,6 \text{ мкМ} \cdot c^{-1} (K_M + 40 \text{ мкМ}) = 480 \text{ мкМ}^2 \cdot c^{-1}$$

$$K_M + 40 \text{ мкМ} = \frac{480 \text{ мкМ}^2 \cdot c^{-1}}{9,6 \text{ мкМ} \cdot c^{-1}}$$

$$K_M + 40 \text{ мкМ} = 50 \text{ мкМ}$$

$$K_M = 50 \text{ мкМ} - 40 \text{ мкМ}$$

$$K_M = 10 \text{ мкМ}$$

Таблица 6-8 Ферменты, для которых отношение k_{cat} / K_M близко к диффузионному пределу ($10^8 - 10^9 M^{-1}c^{-1}$)

Фермент	Субстрат	$k_{cat} (c^{-1})$	$K_M (M)$	$k_{cat} / K_M (M^{-1}c^{-1})$
Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин	$1,4 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^8$
Карбоангидраза	CO_2	$1 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$8,3 \cdot 10^7$
	HCO_3^-	$4 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^7$
Каталаза	H_2O_2	$4 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^0$	$4 \cdot 10^7$
Кротоназа	Кротонил-СоА	$5,7 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^{-5}$	$2,8 \cdot 10^8$
Фумараза	Фумарат	$8 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^{-6}$	$1,6 \cdot 10^8$
	Малат	$9 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^7$
β -Лактамаза	Бензилпенициллин	$2,0 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^8$

Поработав с этим уравнением, вы научитесь легко решать подобные задачи. Например, зная, что $k_{\text{cat}} [E_t] = V_{\text{max}}$, можно найти V_{max} . В данном случае $V_{\text{max}} = 600 \text{ с}^{-1} \cdot 0,020 \text{ мкМ} = 12 \text{ мкМ} \cdot \text{с}^{-1}$. Разделив обе части уравнения 6-26 на V_{max} , получим:

$$\frac{v_0}{V_{\text{max}}} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$v_0 / V_{\text{max}} = 9,6 \text{ мкМ} \cdot \text{с}^{-1} / 12 \text{ мкМ} \cdot \text{с}^{-1} = \\ = [S] / (K_M + [S])$$

Отсюда $K_M = 0,25 [S]$, здесь $K_M = 10 \text{ мкМ}$.

Пример 6-2 ОПРЕДЕЛЕНИЕ

КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

В другом эксперименте по изучению свойств «весазазы» при концентрации фермента $[E_t] = 10 \text{ нМ}$ начальная скорость реакции составила $3 \text{ мкМ} \cdot \text{с}^{-1}$. Какой была концентрация субстрата $[S]$ в этом эксперименте?

Решение. Рассуждая подобным образом, что и в примере 6-1, найдем максимальную скорость реакции при данной концентрации фермента. Она составляет $6 \text{ мкМ} \cdot \text{с}^{-1}$. Обратите внимание, что начальная скорость v_0 здесь точно равна $1/2 V_{\text{max}}$. Вспомните, что по определению константа Михаэлиса K_M равна концентрации субстрата $[S]$, при которой $v_0 = 1/2 V_{\text{max}}$. Таким образом, в этой задаче $[S] = K_M = 10 \text{ мкМ}$. Если бы $v_0 \neq 1/2 V_{\text{max}}$, для нахождения концентрации субстрата следовало бы воспользоваться уравнением $v_0 / V_{\text{max}} = [S] / (K_M + [S])$.

Многие ферменты катализируют реакции с участием двух и большего числа субстратов

До сих пор мы говорили о том, как концентрация субстрата влияет на скорость простой ферментативной реакции $S \rightarrow P$ с единственным субстратом. Однако в большинстве ферментативных реакций с ферментом связываются и претерпевают превращения два или большее число субстратов. Например, в реакции, катализируемой гексокиназой, АТФ и глюкоза

являются субстратами, а АДФ и глюкозо-6-фосфат — продуктами:

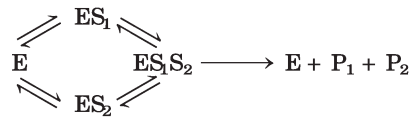


Скорости подобных двухсубстратных реакций также можно анализировать, используя подход Михаэлиса–Ментен. Как видно из табл. 6-6, гексокиназа характеризуется разными значениями K_M для каждого из субстратов.

Ферментативные реакции с участием двух субстратов обычно идут с переносом атома или функциональной группы с одного субстрата на другой. Такие реакции протекают по одному из нескольких известных механизмов. В некоторых случаях субстраты в определенном порядке или случайным образом связываются с ферментом нековалентными связями в тройной комплекс (рис. 6-13, а), причем субстраты могут связываться с ферментом как. В других

а Образование тройного комплекса

Неупорядоченное связывание субстратов:



Упорядоченное связывание субстратов:



б Образование тройного комплекса не происходит (механизм «пинг-понг»)

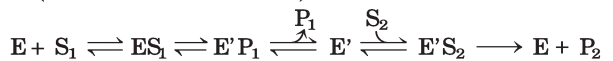


Рис. 6-13. Основные механизмы двухсубстратных ферментативных реакций. а) Фермент и два субстрата образуют тройной комплекс. При упорядоченном связывании сначала должен связаться субстрат 1, а лишь затем происходит продуктивное связывание субстрата 2. При неупорядоченном связывании субстраты могут присоединяться к ферменту в любом порядке. б) Механизм включает несколько последовательных стадий: фермент и субстрат образуют комплекс ES_1 , который превращается в $\text{E}'\text{P}_1$, происходит отщепление первого продукта P_1 , далее модифицированная форма фермента E' связывается со вторым субстратом S_2 в комплекс $\text{E}'\text{S}_2$, который расщепляется до второго продукта P_2 и фермента E (возвращается в реакционный цикл).

случаях сначала первый субстрат превращается в продукт, а лишь затем происходит связывание второго субстрата; тройной комплекс не образуется. Последний случай реализуется в механизме «пинг-понг» (механизм двойного замещения, рис. 6-13, б). Выявить механизм ферментативной реакции часто помогают методы стационарной кинетики (рис. 6-14).

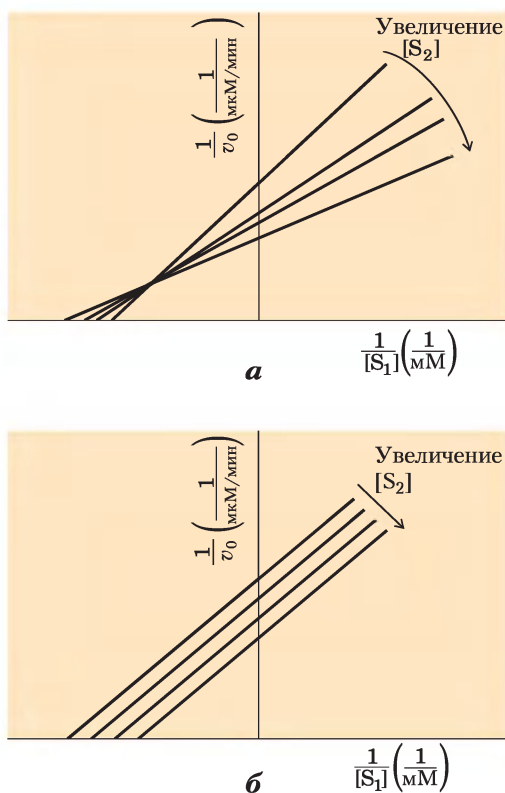


Рис. 6-14. Изучение двухсубстратных реакций методами стационарной кинетики. Данные графики в двойных обратных координатах (доп. б-1) отражают серию экспериментов, в которой изменяли концентрацию субстрата 1 при постоянной концентрации субстрата 2. Такую серию экспериментов выполнили с разными концентрациями субстрата 2 и получили несколько отдельных линий. а) Пересекающиеся линии указывают на образование тройного комплекса. б) Параллельные линии указывают на то, что реакция протекает по механизму «пинг-понг».

Предстационная кинетика может дать дополнительную информацию о последовательности стадий реакции

Итак, хотя при изучении ферментативной реакции можно определить ее механизм, полной информации о деталях механизма таким способом получить не удастся. Методами стационарной кинетики можно определить величины k_{cat} и k_{cat}/K_M . Путем изменения рН или температуры из этих параметров можно извлечь дополнительную информацию о стадиях реакции. Методы стационарной кинетики позволяют определить, образуется ли в процессе реакции тройной комплекс (рис. 6-14). Для получения более полной информации обычно требуется применение сложных экспериментов и расчетов, описание которых выходит за рамки данного изложения. Мы лишь кратко представим читателю один из наиболее важных кинетических подходов изучения механизмов реакции — изучение *предстационной кинетики*.

Полное описание ферментативной реакции подразумевает определение скоростей отдельных реакционных стадий, например скорости связывания фермента с субстратом с образованием комплекса ES. Скорости некоторых стадий реакции могут быть определены в предстационном состоянии независимыми методами (см. с. 287). Условия реакции подбираются таким образом, чтобы можно было проследить за взаимодействием с одним субстратом. Предстационная фаза реакции обычно очень коротка, поэтому при проведении таких экспериментов необходимо применять специальные приемы, позволяющие очень быстро производить перемешивание реагирующих веществ и отбор проб. Одной из задач подобного эксперимента является определение полной картины энергетических изменений в ходе реакции. Как мы обсуждали ранее, скорость реакции и равновесие реакции связаны с изменением свободной энергии. Зная скорость отдельной стадии, можно понять, каким образом определенный фермент использует энергию, что важно для понимания общего механизма реакции. В ряде случаев удается измерить скорость каждой стадии многостадийного ферментативного процесса. Некоторые примеры использования методов предстационной кинетики приведены в разд. 6.4.

Ферменты могут подвергаться обратимому и необратимому ингибированию

Ингибиторы ферментов представляют собой соединения, вмешивающиеся в процесс катализа и тем самым замедляющие ферментативные реакции (вещества, которые ускоряют ферментативные реакции, обычно называют *активаторами*). Ферменты катализируют практически все клеточные процессы, поэтому неудивительно, что ингибиторы ферментов нашли важное применение как фармацевтические препараты. Например, аспирин (ацетилсалициловая кислота) ингибирует фермент, катализирующий первую стадию синтеза простагландинов, участвующих во многих физиологических процессах, в том числе в возникновении болевых ощущений. Ингибиторы ферментов являются полезным инструментом для изучения ферментативных механизмов и метаболических путей в клетках. Существует два основных класса ингибиторов ферментов — обратимые и необратимые.

ОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ. Одним из типов **обратимого ингибирования** является **конкурентное ингибирование** (рис. 6-15, а). Конкурентный ингибитор конкурирует с субстратом за связывание в активном центре фермента. Связывание ингибитора (I) с активным центром препятствует связыванию субстрата. Многие конкурентные ингибиторы имеют сходство с субстратом и образуют с ферментом комплекс EI, который, однако, не может осуществлять катализ. Даже кратковременное связывание такого типа будет снижать эффективность действия фермента. Зная молекулярное строение ингибитора, имеющего сходство с субстратом, мы можем судить о том, какие участки молекулы субстрата участвуют во взаимодействии с ферментом. Действие конкурентных ингибиторов можно проанализировать методами стационарной кинетики. Запишем уравнение Михаэлиса–Ментен (6-9) в присутствии конкурентного ингибитора:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + [S]} \quad (6-28)$$

где

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{и} \quad K_I = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Уравнение 6-28 отражает важные особенности механизма конкурентного ингибирования. Экспериментально определяемый параметр αK_M , т. е. константу Михаэлиса в присутствии ингибитора, часто называют *кажущейся константой Михаэлиса*.

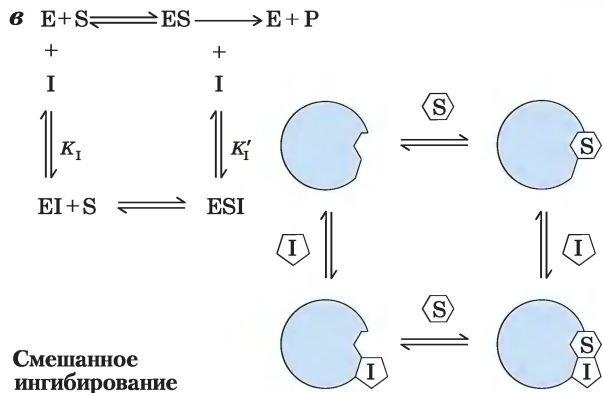
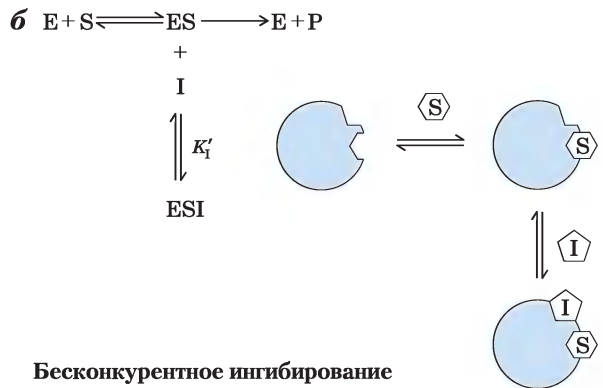
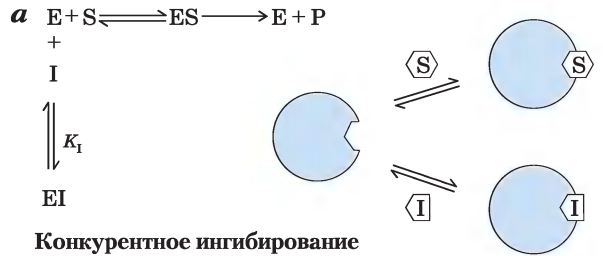


Рис. 6-15. Три типа обратимого ингибирования. а) Конкурентный ингибитор I связывается в активном центре фермента E с образованием комплекса EI; связывание ингибитора с ферментом характеризуется константой K_I . б) Бесконкурентный ингибитор I связывается вне активного центра фермента, причем связывание происходит только с уже образованным комплексом ES. Связывание ингибитора I с комплексом ES характеризуется константой K'_I . в) При смешанном типе ингибирования ингибитор связывается вне активного центра, причем может связываться как с E, так и с ES.

Поскольку связывание ингибитора происходит обратимо, усилить связывание субстрата с ферментом можно, если просто повысить концентрацию субстрата. При $[S] \gg [I]$ вероятность связывания ингибитора с ферментом уменьша-

ется, и реакция протекает с нормальным значением V_{max} . Однако при концентрации субстрата, соответствующей $v_0 = 1/2 V_{max}$, в присутствии ингибитора кажущаяся константа комплексообразования K' возрастает в α раз больше константы

Дополнение 6–2 Кинетические методы для определения типа ингибирования

Тип ингибирования легко определить, если по экспериментальным данным построить графики в двойных обратных координатах (доп. 6-1). Проводят две серии экспериментов с постоянной концентрацией фермента: в первой серии постоянная концентрация субстрата $[S]$, что позволяет измерить влияние роста концентрации ингибитора $[I]$ на начальную скорость v_0 (не пока-

зано); во второй серии постоянная концентрация $[I]$ и варьируют $[S]$. Результаты представляют на графике в обратных координатах $1/v_0$ от $1/[S]$.

На рис. 1 в двойных обратных координатах представлены экспериментальные данные, полученные без ингибитора и с двумя разными концентрациями ингибитора: прямые имеют общую точку пересечения на оси $1/v_0$, но разные углы наклона. Точка пересечения с осью $1/v_0$ соответствует $1/V_{max}$, из чего следует, что значение максимальной скорости не зависит от присутствия конкурентного ингибитора. Вне зависимости от концентрации конкурентного ингибитора субстрат при достаточно высокой концентрации вытесняет ингибитор из активного центра фермента. Над графиком приведено уравнение, полученное в результате преобразования уравнения 6-28, с помощью которого данный график был построен. Для любой концентрации $[I]$ можно найти коэффициент α как тангенс угла наклона прямой. Зная α и $[I]$, можно рассчитать K_I по уравнению $\alpha = 1 + [I] / K_I$.

В случае бесконкурентного и смешанного ингибирования (рис. 2 и 3) графики имеют другой вид. Точки пересечения с осями координат дают параметры V_{max} и K_M .

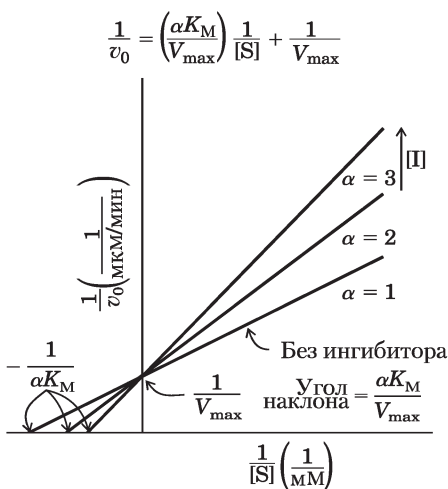


Рис. 1. Конкурентное ингибирование.

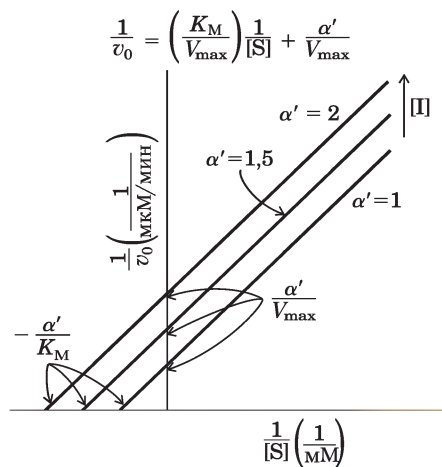


Рис. 2. Бесконкурентное ингибирование.

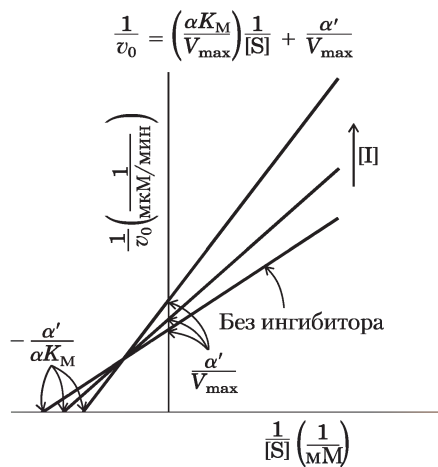


Рис. 3. Смешанное ингибирование.

Михаэлиса K_M . Такое изменение константы Михаэлиса при постоянном значении максимальной скорости является признаком конкурентного ингибирования и легко выявляется при построении графика в двойных обратных координатах (доп. 6-2). Константу связывания ингибитора K_I можно найти из того же графика.

 Лечение людей, принявших внутрь метанол, основано на конкуренции за активный центр фермента печени алкогольдегидрогеназы. Этот фермент преобразует метанол в формальдегид, повреждающий различные ткани организма. Обычным исходом попадания в организм метанола является слепота, поскольку глаза особенно чувствительны к формальдегиду. При отравлении метанолом этанол служит альтернативным субстратом алкогольдегидрогеназы. Действие этанола напоминает действие конкурентного ингибитора, но его концентрация снижается по мере превращения в ацетальдегид, поэтому лечение при отравлении метанолом состоит в медленном внутривенном введении этанола с такой скоростью, чтобы поддерживать постоянной его концентрацию в крови на протяжении нескольких часов. В результате количество образующегося формальдегида уменьшается, метанол же фильтруется почками и выводится с мочой, не нанося вреда организму. ■

Два других типа обратимого ингибирования — бесконкурентное и смешанное — часто описывают в терминах односубстратной ферментативной кинетики, но в реальности они встречаются только для ферментов, имеющих несколько субстратов. **Бесконкурентный ингибитор** (рис. 6-15, б) связывается вне активного центра фермента, и, в отличие от конкурентного ингибитора, только с комплексом ES. В присутствии бесконкурентного ингибитора уравнение Михаэлиса–Ментен принимает следующий вид:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + \alpha' [S]} \quad \text{🔑 (6-29)}$$

где

$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad \text{и} \quad K_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

В соответствии с уравнением 6-29 при высоких концентрациях субстрата v_0 приближается к V_{\max}/α' . Таким образом, бесконкурентный ингибитор снижает измеряемое значение V_{\max} . Кажущаяся константа Михаэлиса также снижается, поскольку $[S]$, требуемая для достижения $1/2 V_{\max}$, снижается в α' раз.

Ингибитор, действующий по механизму **смешанного типа** (рис. 6-15, в), также связывается вне активного центра, но как с E, так и с ES. Уравнение скорости для случая смешанного ингибирования имеет вид

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]} \quad \text{🔑 (6-30)}$$

Смешанный тип ингибирования обычно изменяется как K_M , так и V_{\max} . Особый случай ингибирования смешанного типа, возникающий при $\alpha = \alpha'$ и редко наблюдающийся на практике, называют **неконкурентным ингибированием**. Анализируя уравнение 6-30, можно понять, что неконкурентный ингибитор изменяет V_{\max} , но не влияет на K_M .

Уравнение 6-30 в общем виде отражает влияние обратимых ингибиторов: его упрощения при $\alpha' = 1,0$ или $\alpha = 1,0$ приводят к уравнениям для конкурентного и бесконкурентного ингибирования соответственно. На основании этого уравнения мы можем сделать общие выводы относительно влияния ингибиторов на отдельные кинетические параметры. Для всех обратимых ингибиторов кажущееся значение $V_{\max, \text{каж}} = V_{\max}/\alpha'$, поскольку при достаточно высоких концентрациях субстрата правая часть уравнения 6-30 всегда упрощается до V_{\max}/α' . Для конкурентных ингибиторов $\alpha' = 1,0$ и, следовательно, не принимается во внимание. Используя это выражение для $V_{\max, \text{каж}}$, можно получить общее выражение для кажущейся константы Михаэлиса и показать, как этот параметр изменяется в присутствии обратимых ингибиторов. Кажущаяся константа Михаэлиса равна концентрации субстрата, при которой $v_0 = 1/2 V_{\max, \text{каж}}$, иначе говоря, $v_0 = V_{\max}/2\alpha'$. Это условие выполняется при $[S] = \alpha K_M/\alpha'$. Таким образом, $K_{M, \text{каж}} = \alpha K_M/\alpha'$. Как видно из табл. 6-9, это выражение упрощается, если α или α' равны 1 (т. е. для бесконкурентного или конкурентного ингибитора).

Таблица 6-9

Влияние обратимых ингибиторов на $V_{\max, \text{каж}}$ и $K_{M, \text{каж}}$

Тип ингибирования	$V_{\max, \text{каж}}$	$K_{M, \text{каж}}$
Нет ингибитора	V_{\max}	K_M
Конкурентный	V_{\max}	αK_M
Бесконкурентный	V_{\max}/α'	K_M/α'
Смешанный	V_{\max}/α'	$\alpha K_M/\alpha'$

На практике бесконкурентное и смешанное ингибирование наблюдается только для ферментов с несколькими субстратами (скажем, S_1 и S_2) и широко применяется для экспериментального изучения таких ферментов. Если ингибитор связывается с центром, который обычно занят субстратом 1, то в экспериментах с изменением концентрации S_1 он может вести себя как конкурентный ингибитор. Если ингибитор связывается с центром, который обычно занят субстратом 2, то он может выступать в качестве бесконкурентного ингибитора или ингибитора смешанного типа по отношению к S_1 . Наблюдаемый на практике тип ингибирования зависит от того, является связывание S_1 и S_2 с ферментом упорядоченным или случайным; по экспериментальным данным можно судить о порядке присоединения субстратов и высвобождения продуктов. Часто дополнительную информацию можно получить, когда один из продуктов реакции выступает в качестве ингибитора. Если в реакционной среде присутствует только один из двух продуктов реакции, то обратная реакция происходить не может. Однако этот продукт обычно связан с активным центром и поэтому действует в качестве ингибитора. В кинетических методах изучения механизма двухсубстратной ферментативной реакции используются различные комбинации продуктов и ингибиторов.

Пример 6-3 ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА НА КОНСТАНТУ МИХАЭЛИСА

Исследователи, изучавшие «веселазу» (см. примеры 6-1 и 6-2), выяснили, что мощным конкурентным ингибитором в этой реакции является «вещество» СТРЕСС. Добавление 1 нМ СТРЕСС повышает измеряемое значение K_M для субстрата ГРУСТЬ в 2 раза. Определите значения α и α' в этих условиях.

Решение. Вспомним, что кажущаяся константа K'_M (K_M в присутствии конкурентного ингибитора) равна αK_M . Поскольку в присутствии 1 нМ СТРЕСС K_M для ГРУСТЬ увеличивается вдвое, α должно быть равно 2. По определению для конкурентного ингибитора $\alpha' = 1$.

НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ. К **необратимым ингибиторам** относятся те, которые образуют ковалентную связь с ферментом или выводят из строя его функциональные группы, необходимые для катализа, а также те, которые способны образовывать особенно устойчивые нековалентные комплексы с ферментом. Образование ковалентной связи между необратимым ингибитором и ферментом — это довольно распространенное явление. Необратимые ингибиторы служат полезными инструментами при изучении механизмов реакции. Если ингибитор образует ковалентную связь с определенными остатками фермента, в результате чего происходит его инактивация, то идентификация этих остатков помогает определить ключевые аминокислоты, задействованные в катализе (рис. 6-16).

Особым случаем необратимого ингибирования является так называемое **суицидное ингибирование**. До тех пор, пока ингибитор такого рода не связался в активном центре фермента, он обладает сравнительно низкой реакционной способностью. **Суицидный ингибитор** претерпевает несколько стадий ферментативного превращения, но вместо того, чтобы превратиться в нормальный продукт, он превращается в соединение с очень высокой реакционной способностью, которое необратимо связывается с ферментом. Подобные соединения иногда называют **субстратоподобными ингибиторами**, поскольку они инактивируют

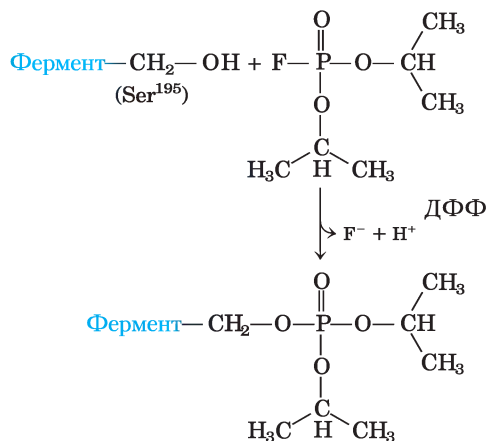


Рис. 6-16. Необратимое ингибирование. Взаимодействие химотрипсина с диизопропилфторфосфатом (ДФФ) приводит к необратимому ингибированию фермента. На этом основании был сделан вывод, что ключевым остатком серина в активном центре химотрипсина является Ser¹⁹⁵.

фермент, используя его собственный нормальный механизм действия. Такие ингибиторы играют важную роль в современном подходе к *направленному поиску лекарственных препаратов*, в котором синтез новых фармакологических средств основан на механизмах реакций. Правильно сконструированный суицидный ингибитор специфичен лишь для одного фермента и не вступает в реакцию, пока не свяжется с активным центром этого фермента. Поэтому лекарства, созданные на основании данного подхода, оказывают заметно меньше побочных эффектов (см. доп. 22-3). Несколько примеров необратимых ингибиторов, важных для медицины, приведены в конце разд. 6.4.

Зависимость ферментативной активности от pH

Ферменты характеризуются оптимальным значением (или диапазоном значений) pH, при котором их активность максимальна (рис. 6-17); при отклонении pH от оптимума активность фермента снижается. Ничего удивительного в этом нет. Боковые цепи аминокислотных остатков в активном центре фермента могут проявлять свойства слабых кислот или оснований, поэтому активность ферментов зависит от их состояния ионизации. Кроме того, ионизованные боковые цепи в молекуле фермента могут принимать активное участие в поддержании структуры белка. Например, удаление протона от остатка гистидина может разрушить ионное взаимодействие, важное для стабилизации активной конформации фермента. Менее распространенной причиной чувствительности ферментативной реакции к изменениям pH является реакция нейтрализации (титрование) группы в составе молекулы субстрата.

Диапазон pH, в котором происходит изменение активности фермента, может указывать на тип аминокислотных остатков, участвующих в катализе (табл. 3-1). Например, изменение активности фермента в области pH 7,0 может говорить о нейтрализации (титровании) остатка His. Однако интерпретировать влияние pH следует с осторожностью. В составе молекулы белка pK_a аминокислотного остатка может быть сильно изменено. Например, локализованный поблизости положительный заряд может снизить, а отрицательный заряд может повысить pK_a остатка Lys. Подобные эффекты часто приводят к тому, что

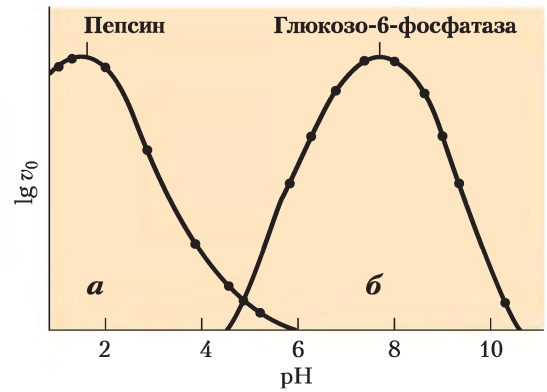


Рис. 6-17. Зависимость активности двух ферментов от pH. Данные кривые построены на основании измерения начальных скоростей реакции в буферах с различными значениями pH. Поскольку pH — логарифмический параметр, изменение pH на 1 означает десятикратное изменение концентрации протонов; шкала v_0 также логарифмическая. Оптимальное значение pH для активности фермента обычно лежит в физиологическом диапазоне pH, в котором фермент функционирует. а) Пепсин, расщепляющий определенные пептидные связи в белках в процессе пищеварения в желудке, имеет оптимум активности при pH ~1,6. Значение pH желудочного сока может варьировать в интервале 1–2. б) Глюкозо-6-фосфатаза гепатоцитов (клеток печени) имеет оптимум активности pH ~7,8; этот фермент отвечает за поступление в кровь глюкозы. В цитозоле гепатоцитов в норме pH ~7,2.

pK_a изменяется по сравнению со свободной аминокислотой. Например, pK_a остатка Lys в ацетатдекарбоксилазе составляет 6,6 (в свободном лизине 10,5), что связано с электростатическим влиянием расположенных поблизости положительных зарядов.

Краткое содержание раздела 6.3 ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА И МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

■ Большинство ферментов можно охарактеризовать некоторым набором кинетических параметров. При добавлении субстрата к ферменту происходит быстрая реакция, и при достижении стационарного состояния скорости образования и распада промежуточного комплекса ES равны. При увеличении концентрации субстрата и постоянной концентрации фермента активность фермента возрастает по

гиперболической функции и приближается к максимальному значению V_{\max} , при котором практически весь фермент находится в комплексе с субстратом.

- Концентрация субстрата, при которой достигается $1/2 V_{\max}$, называется константой Михаэлиса (K_M), которая характеризует данный фермент по отношению к данному субстрату. Уравнение Михаэлиса–Ментен

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

связывает начальную скорость реакции с $[S]$ и V_{\max} через константу Михаэлиса. Кинетику Михаэлиса–Ментен называют стационарной кинетикой.

- Разные ферменты характеризуются различными значениями K_M и V_{\max} . Скорость лимитирующей стадии ферментативной реакции при насыщении описывается константой k_{cat} , называемой числом оборотов. Отношение k_{cat} / K_M удобно использовать при оценке каталитической эффективности фермента. Уравнение Михаэлиса–Ментен также применимо к двухсубстратным реакциям, протекающим через образование тройного комплекса или по механизму «пинг-понг» (двойного замещения).
- Обратимое ингибирование фермента может иметь конкурентный, бесконкурентный или смешанный механизм. Конкурентные ингибиторы конкурируют с субстратом за связывание в активном центре фермента, но не подвергаются дальнейшим превращениям. Бесконкурентные ингибиторы связываются только с комплексом ES, причем связывание происходит вне активного центра фермента. При смешанном типе ингибирования ингибитор связывается как с E, так и с ES, но опять же вне активного центра. При необратимом ингибировании ингибитор связывается с активным центром фермента путем образования ковалентных или очень прочных нековалентных связей.
- Каждый фермент характеризуется оптимальным значением (или диапазоном) pH, при котором его активность максимальна.

6.4. Примеры ферментативных реакций

До сих пор мы говорили об общих принципах катализа и ввели некоторые кинетические параметры для описания действия ферментов. Теперь перейдем к рассмотрению примеров механизмов ферментативных реакций.

Для понимания механизма действия фермента надо идентифицировать все его субстраты, кофакторы, продукты и регуляторные молекулы. Более того, необходимо узнать 1) порядок стадий ферментативной реакции, 2) структуру каждого промежуточного соединения (интермедиата), 3) скорости взаимных превращений интермедиатов, 4) структурные взаимоотношения фермента с каждым интермедиатом, 5) энергетический вклад каждой связи, образующейся в промежуточных комплексах и переходных состояниях. На сегодняшний день, вероятно, нет ни одного фермента, для которого ответы на все эти вопросы были бы получены. Однако десятки лет исследовательской работы привели к накоплению большого количества информации, в некоторых случаях весьма подробной, о механизмах действия сотен ферментов.

Далее мы остановимся на механизмах действия четырех ферментов: химотрипсина, гекокиназы, енолазы и лизоцима. Эти примеры, безусловно, не могут отразить все многообразие ферментативных реакций. Наш выбор объясняется отчасти тем, что эти ферменты относятся к наиболее изученным, кроме того, на их примере удобно проиллюстрировать некоторые общие принципы, описанные в данной главе. При обсуждении принципов действия ферментов мы расскажем о ключевых экспериментах, которые позволили их установить. На примере химотрипсина мы еще раз остановимся на тех правилах, которые используются для описания механизмов ферментативных реакций. Многие детали механизмов и экспериментальные данные, конечно, придется опустить, поскольку ни одна книга не смогла бы вместить всю богатейшую историю экспериментов по изучению этих ферментов. Кроме того, здесь мы не будем специально останавливаться на роли коферментов в ферментативной реакции. Различным функциям коферментов больше внимания уделено в части II.

Механизм действия химотрипсина включает стадии ацилирования и деацилирования остатка серина

Исследован химотрипсин из поджелудочной железы быка ($M_r = 25\,191$); эта протеаза специфически катализирует расщепление пептидных связей между остатками ароматических аминокислот Trp, Phe и Tyr. На **рис. 6-18** представлена трехмерная структура химотрипсина и отмечены функциональные группы в его активном центре. Реакция, катализируемая данным ферментом, иллюстрирует принцип стабилизации переходного состояния, а также является клас-

сическим примером общего кислотно-основного и ковалентного катализа.

Химотрипсин ускоряет гидролиз пептидной связи как минимум в 10^9 раз. Он не катализирует прямую атаку пептидной связи молекулой воды, а участвует в образовании переходного ацилированного комплекса. Реакция имеет две четко различимые стадии. На стадии ацилирования происходит расщепление пептидной связи и образование ацилированного производного со сложноэфирной связью между карбонильной группой пептида и ферментом. На стадии деацилирования происходит гидролиз сложноэфирной связи и высвобождение исходной формы фермента.

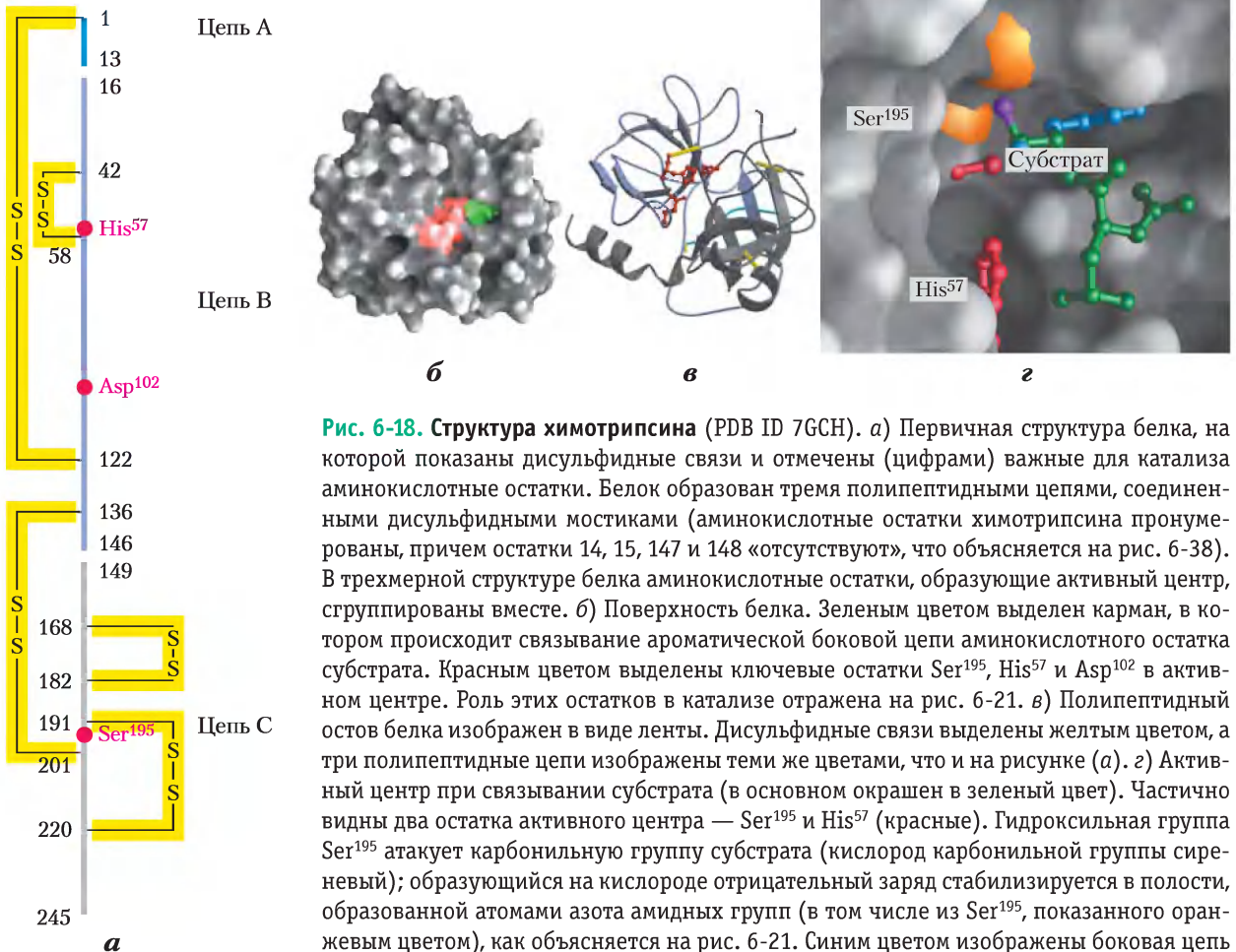


Рис. 6-18. Структура химотрипсина (PDB ID 7GCH). *а*) Первичная структура белка, на которой показаны дисульфидные связи и отмечены (цифрами) важные для катализа аминокислотные остатки. Белок образован тремя полипептидными цепями, соединенными дисульфидными мостиками (аминокислотные остатки химотрипсина пронумерованы, причем остатки 14, 15, 147 и 148 «отсутствуют», что объясняется на рис. 6-38). В трехмерной структуре белка аминокислотные остатки, образующие активный центр, сгруппированы вместе. *б*) Поверхность белка. Зеленым цветом выделен карман, в котором происходит связывание ароматической боковой цепи аминокислотного остатка субстрата. Красным цветом выделены ключевые остатки Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ и Asp¹⁰² в активном центре. Роль этих остатков в катализе отражена на рис. 6-21. *в*) Полипептидный остов белка изображен в виде ленты. Дисульфидные связи выделены желтым цветом, а три полипептидные цепи изображены теми же цветами, что и на рисунке (*а*). *г*) Активный центр при связывании субстрата (в основном окрашен в зеленый цвет). Частично видны два остатка активного центра — Ser¹⁹⁵ и His⁵⁷ (красные). Гидроксильная группа Ser¹⁹⁵ атакует карбонильную группу субстрата (кислород карбонильной группы сиреневый); образующийся на кислороде отрицательный заряд стабилизируется в полости, образованной атомами азота амидных групп (в том числе из Ser¹⁹⁵, показанного оранжевым цветом), как объясняется на рис. 6-21. Синим цветом изображены боковая цепь ароматического аминокислотного остатка и амидный азот расщепляемой пептидной связи (направлены в сторону к читателю и закрывают собой остальную полипептидную цепь субстрата).

Наличие ковалентного ацилированного производного было продемонстрировано методами предстационарной кинетики. Химотрипсин гидролизует не только пептиды, но и небольшие молекулы сложных эфиров и амидов. Данные реакции протекают гораздо медленнее, чем гидролиз пептидов, поскольку энергия связывания с небольшими субстратами ниже; поэтому такие реакции изучать легче. Б. С. Хартли и Б. А. Килби в 1954 г. обнаружили, что скорость гидролиза *n*-нитрофенилацетата под действием химотрипсина, определявшаяся по образованию *n*-нитрофенола, сначала была очень высокой, а потом снижалась (рис. 6-19). Проведя экстраполяцию к нулевому моменту времени, они

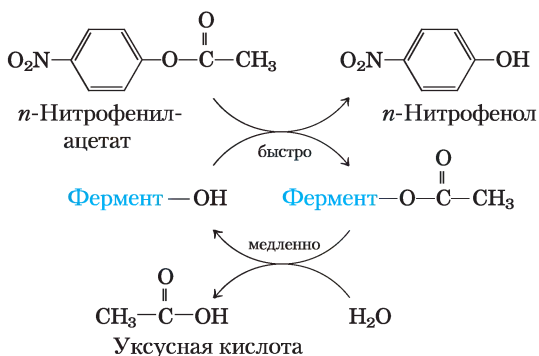
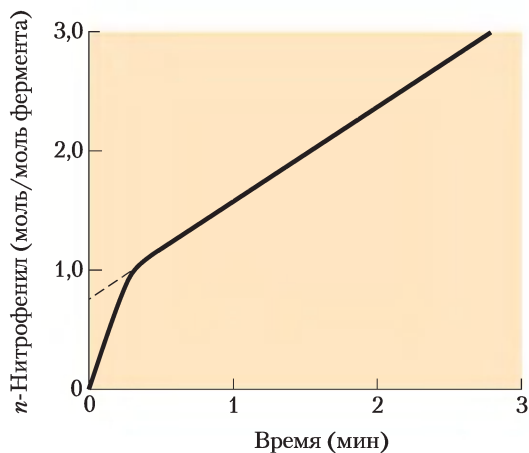


Рис. 6-19. Применение методов предстационарной кинетики для доказательства ацилирования фермента. За гидролизом *n*-нитрофенилацетата следили по образованию окрашенного продукта *n*-нитрофенола. В начале скорость образования *n*-нитрофенола находится почти в стехиометрическом соответствии с количеством фермента — это быстрая стадия ацилирования. Затем скорость снижается, поскольку высвобождение фермента лимитирует медленная реакция деацилирования.

заклучили, что быстрая фаза соответствует ситуации, при которой на каждую молекулу фермента приходится образование одной молекулы *n*-нитрофенола. Хартли и Килби предположили, что в данной реакции происходит быстрое ацилирование всего имеющегося фермента (и высвобождение *n*-нитрофенола) с последующим медленным его деацилированием. Аналогичные результаты были получены для многих других ферментов. Возможность обнаружения быстрой стадии реакции подтверждает правильность использования кинетических методов для идентификации реакционных стадий.

Дополнительные данные о механизме действия химотрипсина были получены при анализе влияния pH на скорость реакции. Зависимость скорости гидролитического расщепления субстратов под действием химотрипсина от pH обычно имеет колоколообразный вид (рис. 6-20). Скорости реакции на рис. 6-20, а были определены при низкой (ненасыщающей) концентрации субстрата и, следовательно, отражают отношение k_{cat} / K_M . Данный график можно разделить на составляющие ветви. Для этого следует при каждом значении pH определить максимальную скорость и построить зависимость k_{cat} от pH (рис. 6-20, б). После определения K_M для каждого значения pH можно также построить зависимость $1/K_M$ от pH (рис. 6-20, в). Из кинетических и структурных данных следует, что изменение k_{cat} связано с состоянием ионизации His⁵⁷. Снижение величины k_{cat} при уменьшении pH происходит из-за протонирования остатка His⁵⁷, который более не способен забирать протон от Ser¹⁹⁵ на первой стадии реакции (рис. 6-21). Такое снижение скорости указывает на важную роль общего основного и общего кислотного катализа в механизме действия химотрипсина. Изменения параметра $1/K_M$ отражают ионизацию α -аминогруппы остатка Ile¹⁶, расположенного на N-конце одной из трех полипептидных цепей химотрипсина. Эта группа образует мостиговую связь с Asp¹⁹⁴, что стабилизирует каталитически активную конформацию фермента. При повышении pH эта группа теряет протон, мостиговая связь рвется и из-за конформационных изменений аминокислотный остаток с ароматической боковой группой не может уже разместиться в гидрофобном кармане так, чтобы знаять его полностью; поэтому константа Михаэлиса увеличивается (рис. 6-18).

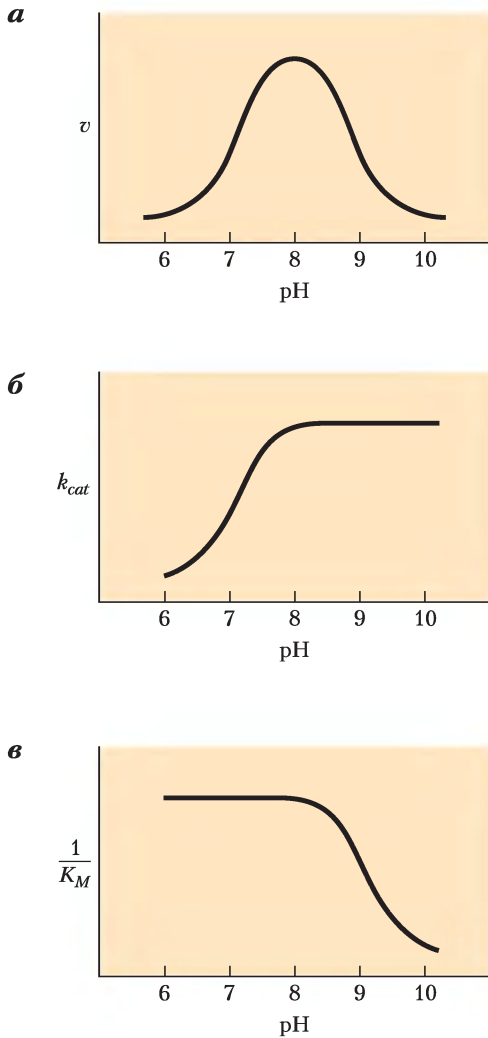


Рис. 6-20. Зависимость активности химотрипсина от рН. а) Зависимость скорости гидролитического расщепления субстратов под действием химотрипсина от рН имеет форму колокола с максимумом при рН 8,0. Скорость v была рассчитана при низкой концентрации субстрата и поэтому пропорциональна отношению k_{cat}/K_M . Кинетическими методами можно определить отдельно значения k_{cat} и K_M и построить графики зависимости каждого из этих параметров от рН (б и в). Из этих графиков видно, что изменение хода кривой при рН > 7 связано с изменением k_{cat} , а при рН > 8,5 — с изменением K_M . Результаты кинетических и структурных исследований показали, что эти перегибы кривой отражают изменения состояния ионизации боковой цепи остатка His⁵⁷ (отсутствует связывания субстрата) и α -аминогруппы Pe¹⁶ (на N-конце цепи В) соответственно. Для оптимальной активности фермента остаток His⁵⁷ должен быть непротонированным, в то время как на Pe¹⁶ протон сохранен.

Нуклеофилом на стадии ацилирования выступает кислород остатка Ser¹⁹⁵. (Протеазы, в каталитическом механизме действия которых принимает участие остаток Ser, называют сериновыми протеазами.) Значение pK_a гидроксильной группы Ser обычно слишком высокое, чтобы непротонированная форма могла присутствовать в значительной концентрации при физиологических значениях рН. Однако в молекуле химотрипсина Ser¹⁹⁵ связан водородными связями с His⁵⁷ и Asp¹⁰² в так называемую **каталитическую триаду**. При связывании пептидного субстрата с химотрипсином происходит небольшое изменение конформации белка, укорачивающее водородную связь между His⁵⁷ и Asp¹⁰², что приводит к более сильному взаимодействию (возникает более прочная водородная связь). Это в свою очередь повышает pK_a His⁵⁷ от ~7 (в свободном гистидине) до >12, что позволяет гистидину действовать в качестве более сильного общего основания и удалять протон из гидроксильной группы Ser¹⁹⁵. Удаление протона предотвращает образование очень невыгодного положительного заряда на гидроксильной группе Ser¹⁹⁵ и делает боковую цепь Ser сильным нуклеофилом. На более поздних стадиях His⁵⁷ выступает в качестве донора протона и протонирует аминогруппу в уходящей группе (в удаляемой части субстрата).

При атаке кислорода остатка Ser¹⁹⁵ на карбонильную группу субстрата образуется короткоживущее четвертичное промежуточное соединение, в котором карбонильный кислород имеет отрицательный заряд (рис. 6-21). Этот заряд, локализованный в кармане активного центра фермента, называемом оксианионной впадиной, стабилизируется водородными связями с участием амидных групп двух пептидных связей в химотрипсине. Одна из этих водородных связей (с участием Gly¹⁹³) присутствует только в данном промежуточном соединении, а также в переходных состояниях при его образовании и распаде; она снижает уровень энергии, необходимый для достижения данных состояний. Это один из примеров, иллюстрирующих роль энергии связывания в катализе.

Значение комплементарности фермента переходному состоянию для осуществления ферментативного катализа обсуждается в доп. 6-3.

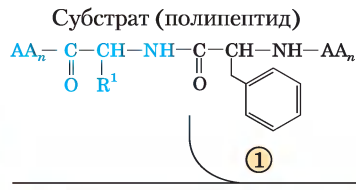
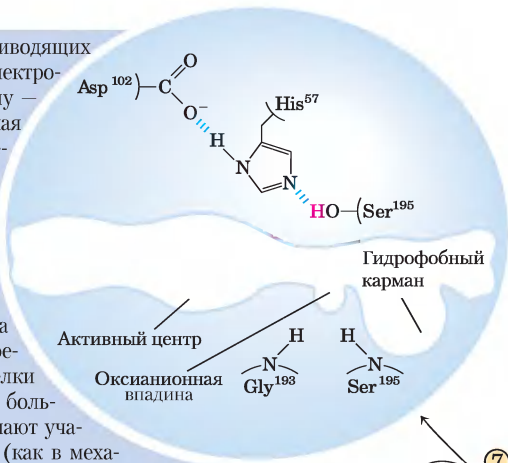
**УЧИМСЯ ОПРЕДЕЛЯТЬ
МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ**

В схемах механизмов реакций, приводящих к образованию и разрыву связей, электроны обозначают точками, а их передачу — изогнутыми стрелками. Ковалентная связь образуется путем обобществления пары электронов. Важные для механизма реакции электроны, не участвующие в образовании связи, также обозначают точками (•OH). Изогнутые стрелки (↷) указывают на направление переноса электронной пары. Перемещение одного электрона (например, в свободнорадикальной реакции) изображается с помощью стрелки в форме рыболовного крючка (⤵). В большинстве реакционных стадий принимают участие неподеленные пары электронов (как в механизме действия химотрипсина).

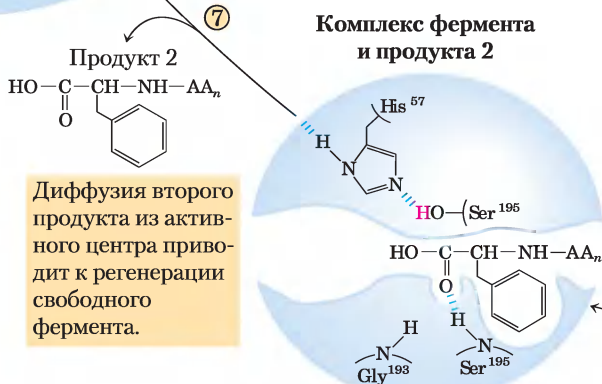
Одни атомы характеризуются более высокой электроотрицательностью, чем другие, т. е. они сильнее притягивают электроны. Например, относительная электроотрицательность снижается в ряду: F > O > N > C ~ S > P ~ H. Поэтому две электронные пары, образующие карбонильную связь C=O, принадлежат этим двум атомам, но более электроотрицательный кислород оттягивает электроны на себя. Во многих реакциях происходит взаимодействие более богатого электронами атома (*нуклеофила*) с электронодефицитным атомом (*электрофилом*). В таблице справа внизу приведены наиболее часто встречающиеся в биохимических процессах нуклеофилы и электрофилы.

Обычно реакция инициируется неподеленной парой электронов нуклеофила. В схеме механизма реакции передачу электронов изображают стрелкой от неподеленной пары электронов к атакуемому электрофильному центру. Если неподеленная электронная пара сообщает нуклеофильной частице формальный отрицательный заряд, то неподеленную пару электронов опускают, а пишут знак заряда и от него уже начинается стрелка. В механизме действия химотрипсина электронная пара комплекса ES, существующего между ① и ②, обеспечивается кислородом гидроксильной группы остатка Ser¹⁹⁵. Эта электронная пара (два из восьми электронов кислорода) находится в начале изогнутой стрелки. Электрофильным центром в данном случае является карбонильный углерод расщепляемой пептидной связи. Атомы C, O и N на внешнем валентном уровне могут иметь по 8 электронов, а атом H — максимум 2. Атомы C, O и N могут переходить в неустойчивое состояние, когда на внешнем электронном уровне менее 8 электронов, но больше 8 электронов они иметь не могут. Таким образом, атакующая карбонильный атом углерода пара электронов кислорода из остатка Ser¹⁹⁵ не может расположиться на валентной оболочке углерода (углерод не может образовывать 5 связей!). Поэтому эти электроны перемещаются к более электроотрицательному карбонильному кислороду. У атома кислорода 8 электронов на внешнем валентном уровне как до, так и после данной химической реакции, но число обобществленных с углеродом электронов уменьшается с 4 до 2, поэтому карбонильный кислород приобретает отрицательный заряд. На следующей стадии электронная пара, сообщающая кислороду отрицательный заряд, перемещается обратно, что приводит к восстановлению карбонильной связи. Вновь электронная пара должна сместиться с атома углерода; на этот раз в ее обобществлении принимает участие аминокгруппа пептидной связи. Это приводит к разрыву пептидной связи. Механизм дальнейших стадий аналогичен.

**Химотрипсин
(свободный фермент)**



При связывании субстрата боковая цепь соседнего пептидного остатка устранивается в гидрофобном кармане фермента, так что пептидная связь располагается необходимым образом.



НУКЛЕОФИЛЫ

- Отрицательно заряженный кислород (например, в депротонированной гидроксильной группе или ионизированной карбоксильной группе)
- Отрицательно заряженная сульфидрильная группа
- Карбанион
- Незаряженная аминокгруппа
- Имидазол
- Гидроксид-ион

ЭЛЕКТРОФИЛЫ

- Атом углерода в карбонильной группе (более электроотрицательный кислород карбонильной группы оттягивает электроны на себя)
- Протонированная иминогруппа (атом углерода активирован для атаки нуклеофилом)
- Фосфор фосфатной группы
- Протон

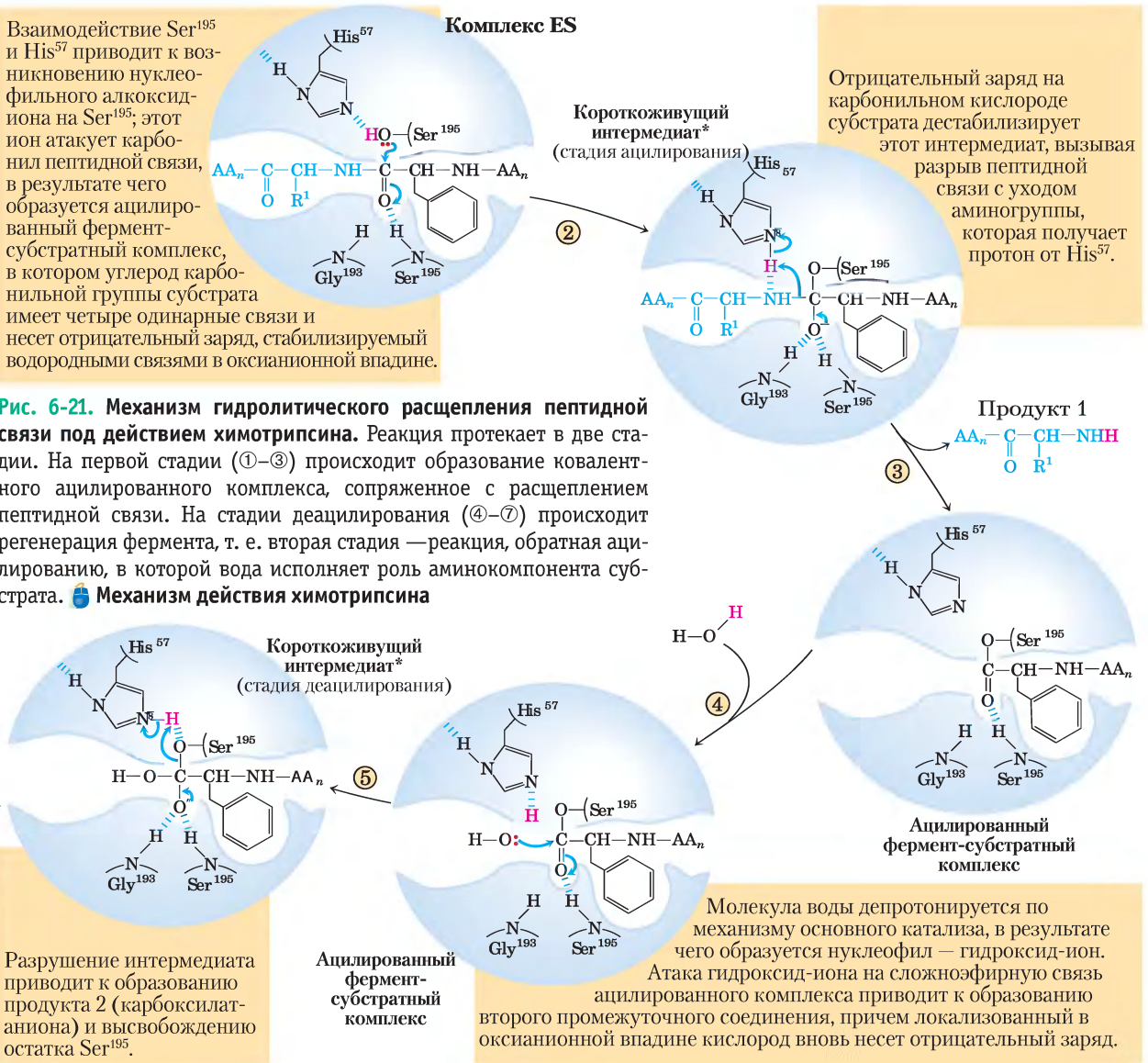


Рис. 6-21. Механизм гидролитического расщепления пептидной связи под действием химотрипсина. Реакция протекает в две стадии. На первой стадии (①–③) происходит образование ковалентного ацилированного комплекса, сопряженное с расщеплением пептидной связи. На стадии деацилирования (④–⑦) происходит регенерация фермента, т. е. вторая стадия — реакция, обратная ацилированию, в которой вода исполняет роль аминокетильной группы субстрата. **Механизм действия химотрипсина**

* Четвертичные промежуточные соединения, образующиеся в катализируемой химотрипсином реакции, иногда называют переходным состоянием, что может внести путаницу. *Промежуточным соединением* (интермедиатом) считают такое химическое соединение, время жизни которого меньше времени одного молекулярного колебания ($\sim 10^{-13}$ с). Существование *переходного состояния* ограничено участком координаты реакции с максимальной свободной энергией и не характеризуется временем жизни. Интермедиаты, образующиеся на двух стадиях, очень похожи как по энергетике, так и по строению; переходные состояния возникают при образовании и распаде этих интермедиатов. Таким образом, интермедиат является обязательной стадией образования связи, а переходное состояние — это часть реакционного процесса. В случае химотрипсина тесная взаимосвязь интермедиата и переходного состояния иногда приводит к смешению этих понятий. Более того, взаимодействие отрицательно заряженного кислорода с амидными атомами азота в оксианионной впадине, которое часто называют стабилизацией переходного состояния, в этом случае играет роль и в стабилизации интермедиата. Не все промежуточные соединения являются настолько короткоживущими, что напоминают переходные состояния. Ацилированный химотрипсин гораздо более устойчив, его можно легко обнаружить и изучать; его нельзя спутать с переходным состоянием.

Дополнение 6–3 Доказательства комплементарности фермента и переходного состояния

Изучение переходного состояния затруднено из-за слишком короткого времени жизни. Однако для понимания механизма катализа необходимо знать, каким образом происходит взаимодействие между ферментом и субстратом в ходе реакции. Комплементарность фермента и переходного состояния можно считать обязательным условием катализа, поскольку изменение энергетического барьера с образованием переходного состояния происходит только в том случае, если имеет место катализ. Как получить доказательства комплементарности фермента и переходного состояния? К счастью, для решения этой проблемы в руках исследователей есть множество способов — как старых, так и новых. Каждый из этих способов вносит свой вклад в обоснование принципа действия ферментов.

Связь структуры и каталитической активности

Если фермент комплементарен переходному состоянию, то некоторые функциональные группы фермента и субстрата должны взаимодействовать между собой не в ES-комплексе, а преимущественно в переходном состоянии. Замена функциональных групп не должна сильно сказываться на константе комплексобразования и, следовательно, не должно заметно изменить такие константы, как константа диссоциации (K_d ; или K_M , если $K_d = K_M$), характеризующие равновесие $E + S \rightleftharpoons ES$. Но изменение тех же групп долж-

но сильно отразиться на общей скорости реакции (т. е. на значении k_{cat} или отношении k_{cat} / K_M), поскольку при связывании субстрата не происходит тех взаимодействий, которые могли бы снизить энергию активации.

Превосходной иллюстрацией данного эффекта являются кинетические эксперименты с серией родственных субстратов химотрипсина (рис. 1). В норме химотрипсин гидролизует пептидную связь, расположенную рядом с ароматической аминокислотой. На рис. 1 приведены формулы низкомолекулярных субстратов, которые были использованы в качестве моделей природных субстратов — длинных пептидов или белков. В каждом следующем субстрате (от А к С) добавлялась дополнительная группа (выделена цветом). Как видно из таблицы, добавление групп к молекуле субстрата почти не оказывало влияния на константы Михаэлиса, однако сильно увеличивало k_{cat} и k_{cat} / K_M . Именно этого эффекта и следует ожидать в том случае, если взаимодействие между ферментом и субстратом больше влияет на стабилизацию переходного состояния. Данные результаты также показывают, что скорость реакции в значительной степени зависит от фермент-субстратных взаимодействий на участках, удаленных от реагирующих групп. Подробно механизм действия химотрипсина описан в тексте.

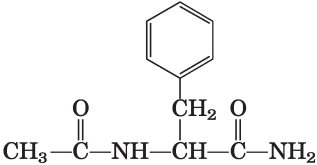
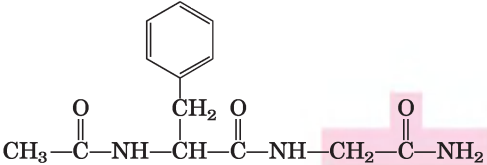
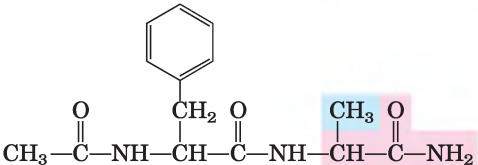
		k_{cat} (с ⁻¹)	K_M (мМ)	k_{cat}/K_M (моль ⁻¹ ·л·с ⁻¹)
Субстрат А		0,06	31	2
Субстрат В		0,14	15	10
Субстрат С		2,8	25	114

Рис. 1. Небольшие изменения в строении субстрата и кинетические параметры гидролитического отщепления амидов при действии химотрипсина.

Дополнительно можно модифицировать сам фермент, чтобы ликвидировать определенные фермент-субстратные взаимодействия. Этого можно добиться путем замены определенных аминокислотных остатков методом направленного мутагенеза (рис. 9-11). Результаты подобных экспериментов также демонстрируют важность энергии связывания для стабилизации переходного состояния.

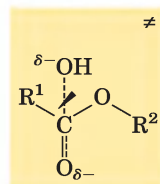
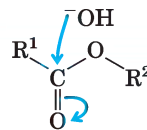
Аналоги переходного состояния

Даже если переходное состояние нельзя увидеть непосредственно, химик часто может предсказать его примерную структуру, основываясь на данных о механизме реакции. Переходное состояние, по определению, является временным и настолько неустойчивым, что прямые измерения взаимодействий между интермедиатом и ферментом не представляются возможными. Однако в некоторых случаях удается создать устойчивые молекулы, структура которых напоминает переходное состояние. Их называют **аналогами переходного состояния**. В принципе, эти вещества должны связываться с ферментом более прочно, чем связан субстрат в комплексе ES, поскольку они лучше соответствуют структуре активного центра (т. е. образуют большее число слабых связей), чем сам субстрат. Идея поиска аналогов переходного состояния была высказана Полингом в 1940-х гг. и воплощена в жизнь для нескольких ферментов. Ограничением данного подхода является то, что аналоги не могут абсолютно точно имитировать переходное состояние. Некоторые из них связываются с ферментом в 10^2 – 10^6 раз прочнее, чем обычные субстраты, что служит доказательством комплементарности активного центра фермента именно этому переходному состоянию. Тот же принцип используется сегодня при создании новых лекарственных препаратов. Мощные лекарства на основе ингибиторов протеаз, направленные на борьбу с ВИЧ, были созданы как аналоги переходного состояния, образующие прочные связи с активным центром протеазы ВИЧ.

Каталитические антитела

Если можно создать аналог переходного состояния для реакции $S \rightarrow P$, то антитела, прочно связывающиеся с этими аналогами, возможно, окажутся способными катализировать реакцию $S \rightarrow P$. Антитела (или иммуноглобулины, рис. 5-23) играют ключевую роль в ответах иммунной системы. Если аналог переходного

Гидролиз сложного эфира

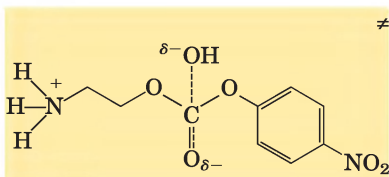
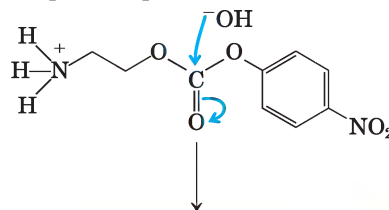


Несколько стадий \rightarrow Продукты

Переходное состояние

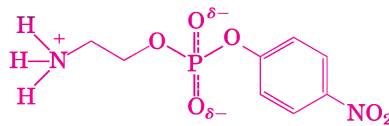


Гидролиз карбоната



Несколько стадий \rightarrow Продукты

Переходное состояние



Аналог (эфир фосфорной кислоты)

Рис. 2. Предполагаемые переходные состояния для реакций гидролиза сложных эфиров и карбонатов. Хорошими аналогами переходного состояния для этих реакций являются эфиры фосфоновой и фосфорной кислоты соответственно.

Дополнение 6–3 Доказательства комплементарности фермента и переходного состояния

состояния использовать в качестве эпитопа для стимуляции продукции антител, то связывающиеся с ним антитела являются потенциальными катализаторами соответствующей реакции. Использование таких «каталитических антител» (их часто называют абзимами от англ. *antibody* и *enzyme*. — Прим. ред.) впервые было предложено В. П. Дженксом в 1969 г. и вошло в практику с развитием лабораторных методов, позволяющих получать достаточные количества идентичных антител, связывающихся с одним специфическим антигеном (моноклональных антител, гл. 5).

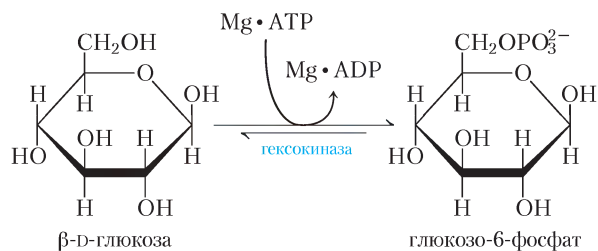
Пионерные работы, выполненные в лабораториях Ричарда Лернера и Петера Шульца, привели к выделению ряда моноклональных антител, катализирующих гидролиз сложных эфиров или карбонатов (рис. 2). В этих реакциях в результате атаки воды (OH^-) на карбонильный углерод образуется переходное состояние с четвертичным карбонильным углеродом, в котором на карбонильном атоме кислорода сосредоточен частичный отрицательный заряд. Эфиры фосфоновой

кислоты похожи по структуре и заряду на переходное состояние в реакции гидролиза сложных эфиров, что делает возможным их использование в качестве аналогов переходного состояния. Для гидролиза карбонатов используются эфиры фосфорной кислоты. Было обнаружено, что прочно связывающиеся с фосфонатами или фосфатами антитела ускоряют соответствующие реакции гидролиза сложного эфира или карбоната в 10^3 – 10^4 раз. Структурный анализ нескольких из этих каталитических антител показал, что боковые цепи определенных аминокислотных остатков расположены таким образом, что они могли бы взаимодействовать с субстратом в переходном состоянии.

Каталитические антитела обычно не достигают каталитической эффективности ферментов, однако возможность их медицинского и промышленного применения очевидна. Например, было предложено использовать каталитические антитела, созданные для деградации кокаина, при лечении кокаиновой зависимости.

Индукированное соответствие при связывании субстрата с гексокиназой

Гексокиназа дрожжей ($M_r = 107\,862$) катализирует обратимую двухсубстратную реакцию:



АТФ и АДФ всегда связываются с ферментами в виде комплексов с ионами Mg^{2+} .

Гидроксильная группа у атома С-6 глюкозы (на которую в ферментативной реакции переносится γ -фосфорильная группа АТФ) по реакционной способности похожа на гидроксил в молекуле воды; кроме того, вода легко проникает в активный центр фермента. Однако в присутствии гексокиназы вероятность протекания реакции с глюкозой повышается в 10^6 раз. Способность фермента различать воду и глюкозу связана с конформационными изменениями в его молекуле,

происходящими при связывании «правильного» субстрата (рис. 6-22). Таким образом, механизм действия гексокиназы является хорошим примером индуцированного соответствия. Если в среде нет глюкозы, то фермент пребывает в неактивном состоянии и аминокислотные остатки его активного центра находятся в нереакционноспособном положении. При связывании глюкозы (но не воды) и $\text{Mg} \cdot \text{АТФ}$ энергия связывания тратится на конформационные изменения в молекуле гексокиназы и переводит ее в активное состояние.

Данная модель была подтверждена кинетическими исследованиями. Пятиуглеродный сахар ксилоза, по стереохимическим свойствам напоминающий глюкозу, но содержащий на один атом углерода меньше, связывается с гексокиназой, но не может фосфорилироваться. Тем не менее добавление в реакционную смесь ксилозы увеличивает скорость гидролиза АТФ. Очевидно, связывание ксилозы вызывает переход гексокиназы в активное конформационное состояние, и «обманутый» фермент фосфорилирует воду. Эта реакция гексокиназы также демонстрирует, что специфичность фермента не всегда заключается в связывании одного-единственного вещества.

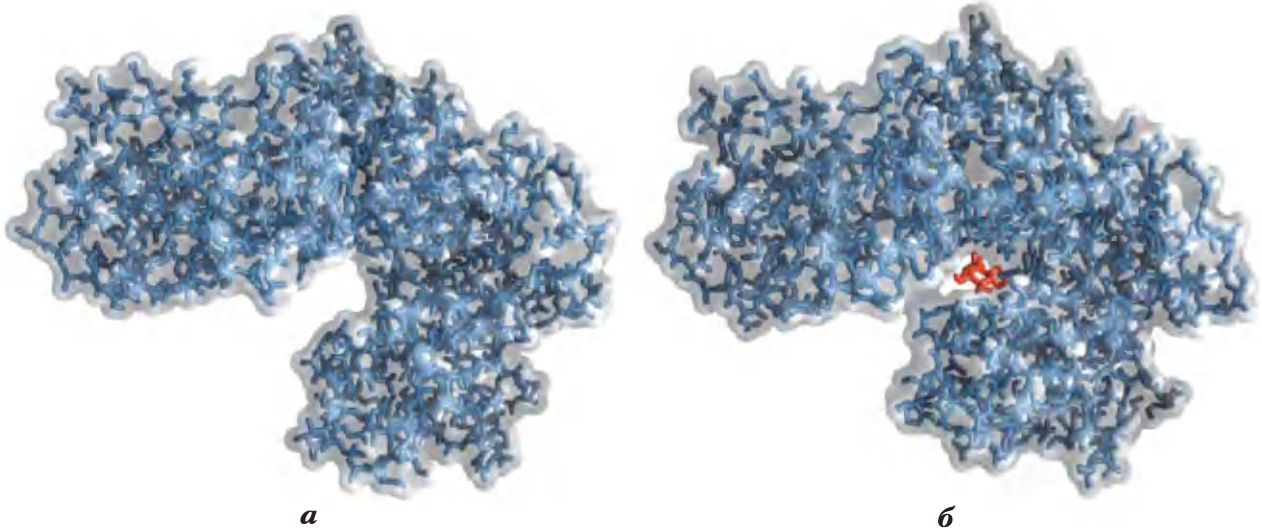
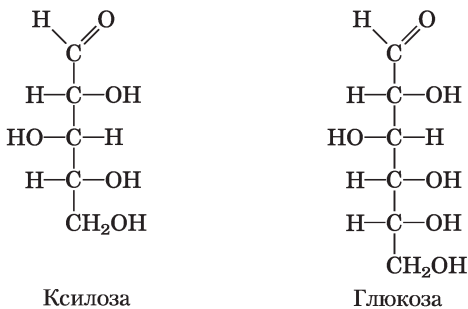


Рис. 6-22. Индуцированное соответствие в молекуле гексокиназы. а) Гексокиназа имеет U-образную форму (PDB ID 2YHX). б) Связывание D-глюкозы (выделена красным цветом) приводит к конформационным изменениям, и карман закрывается (PDB ID 1HKG и PDB ID 1GLK).

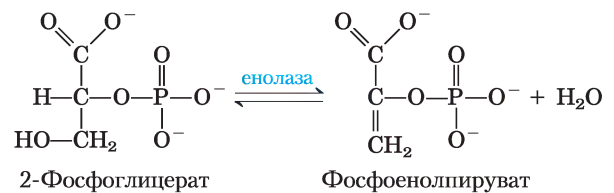
В данном случае специфичность фермента проявляется не в образовании комплекса ES, а в отношении скоростей последующих каталитических стадий. Для проникновения воды в активный центр нет препятствий, но скорость реакции сильно возрастает в присутствии функционального акцептора фосфорильной группы (глюкозы).



Индуцированное соответствие является лишь одним аспектом механизма действия гексокиназы. Подобно химотрипсину, этот фермент также использует несколько стратегий катализа. Например, аминокислотные остатки активного центра (те, что принимают правильное положение в результате конформационных изменений при связывании субстрата) участвуют в общем кислотно-основном катализе и стабилизации переходного состояния.

Механизм реакции енолазы требует присутствия ионов металла

Еще один гликолитический фермент енолаза катализирует обратимую дегидратацию 2-фосфоглицерата с образованием фосфоенолпирувата:



Енолаза дрожжей ($M_r = 93\,316$) представляет собой димер, каждая субъединица которого состоит из 436 аминокислотных остатков. Ферментативная реакция с участием енолазы иллюстрирует один из типов катализа с участием ионов металлов, а также является еще одним примером общего кислотно-основного катализа и стабилизации переходного состояния. Реакция протекает в две стадии (рис. 6-23, а). Сначала остаток Lys³⁴⁵ действует в качестве общего основания, отнимая протон от атома C-2 2-фосфоглицерата. Затем остаток Glu²¹¹ вы-

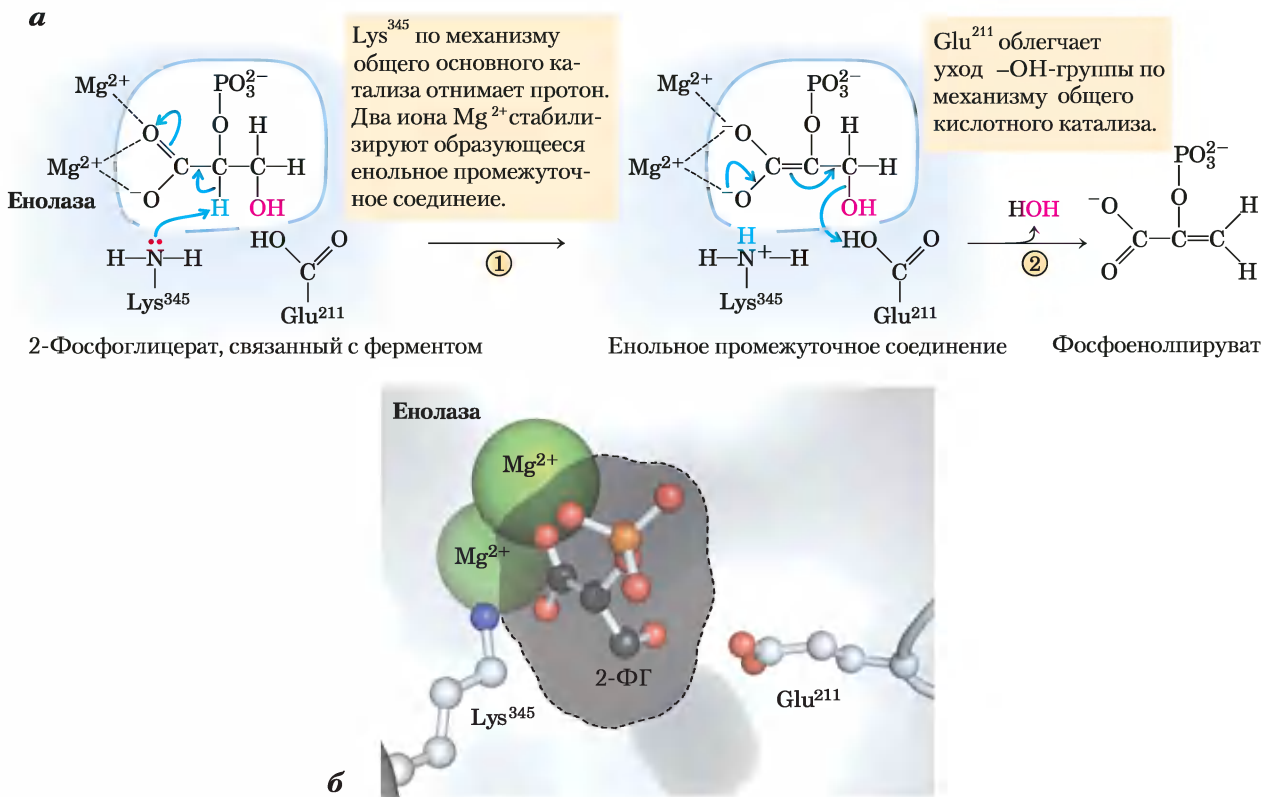


Рис. 6-23. Механизм реакции. Двухстадийная реакция, катализируемая енолазой. а) Механизм превращения 2-фосфоглицерата (2-ФГ) в фосфоенолпируват. Карбоксильная группа 2-ФГ координирована двумя ионами магния в активном центре фермента. б) Положение субстрата, ионов Mg^{2+} , Lys^{345} и Glu^{211} в активном центре енолазы. Атомы водорода не показаны. Все атомы кислорода в молекуле 2-ФГ изображены розовым цветом, а атом фосфора — оранжевым (PDB ID 1ONE).

ступает в роли общей кислоты и отдает протон уходящей ОН-группе. Протон в С-2 положении 2-фосфоглицерата не очень «кислый» и поэтому легко не удаляется. Однако в активном центре фермента 2-фосфоглицерат участвует в довольно сильных ионных взаимодействиях с двумя связанными ионами Mg^{2+} (рис. 6-23, б). В результате протон у атома С-2 становится более «кислым» (pK_a уменьшается) и удаляется легче. В каталитическом механизме задействованы также водородные связи с участием других аминокислотных остатков активного центра. Различные взаимодействия приводят к эффективной стабилизации как енольного промежуточного соединения, так и переходного состояния, предшествующего его образованию.

Механизм действия лизоцима включает две последовательные стадии нуклеофильного замещения

Лизоцим — природное антибактериальное вещество, присутствующее в слезной жидкости и яичном белке. Лизоцим куриного белка ($M_r = 14\,296$) представляет собой мономер, состоящий из 129 аминокислотных остатков. Он был первым ферментом, для которого в 1965 г. Дэвид Филлипс с сотрудниками определили трехмерную структуру. Молекула лизоцима удерживается четырьмя дисульфидными мостиками и имеет длинную расщелину, в которой расположен его активный центр (рис. 6-24, а). Более пяти десятилетий активного изучения лизоцима привели к созданию детальной картины, отражающей его структуру и активность.

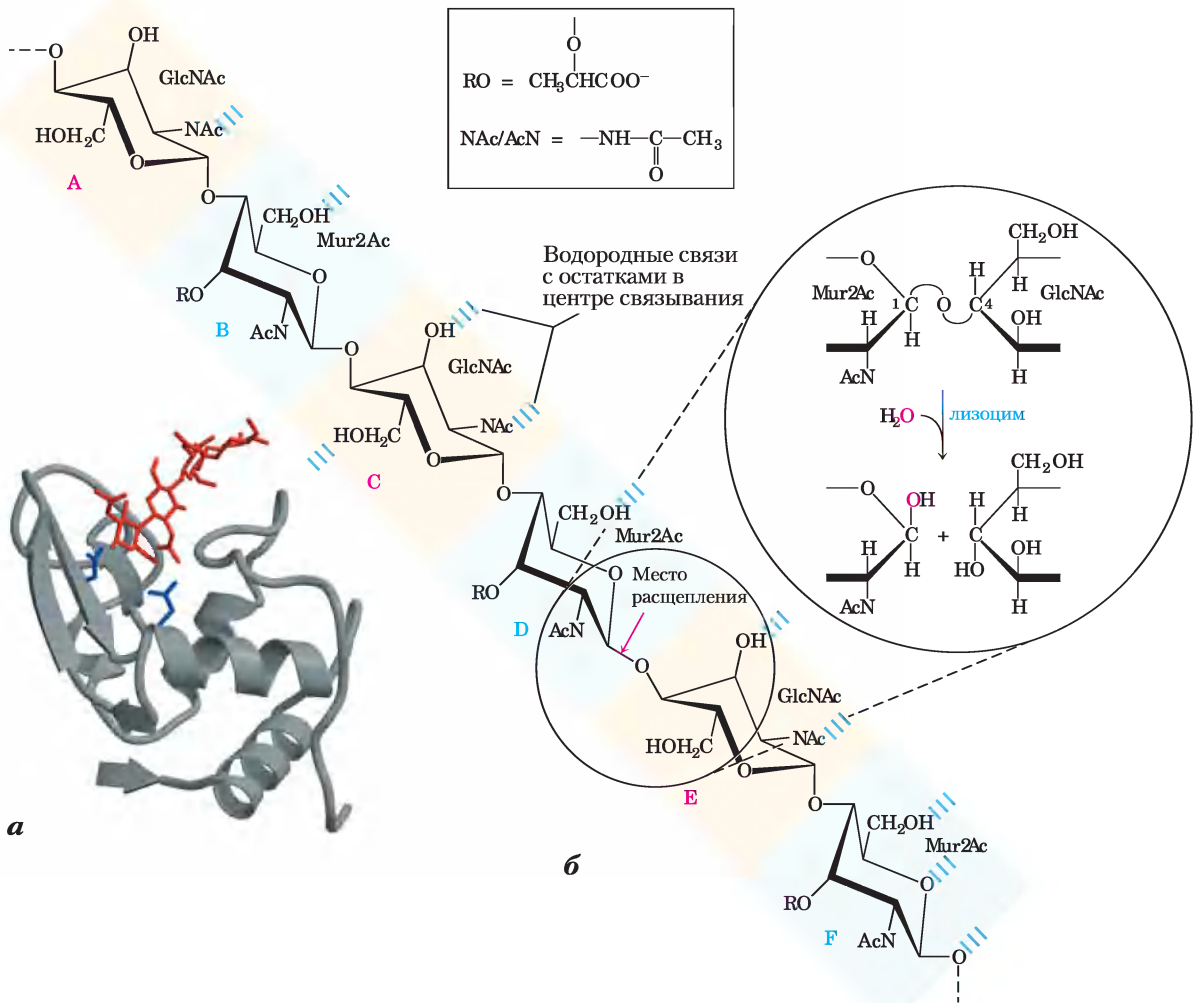


Рис. 6-24. Структура лизоцима яичного белка и катализируемая им реакция. *а*) Ленточная модель структуры белка: остатки Glu³⁵ и Asp⁵² в активном центре фермента изображены в виде синих стержней, а связанный субстрат выделен красным цветом (PDB ID 1LZE). *б*) Реакция, катализируемая лизоцимом яичного белка. Изображен фрагмент пептидогликана с указанием участков связывания в молекуле фермента, обозначенных буквами от А до F. Красная стрелка указывает на расщепляемую гликозидную связь C—O, расположенную между остатками сахаров, локализованных в участках связывания D и E. *Вставка:* схема реакции; красным цветом выделен кислород, происходящий из молекулы воды. Принятые сокращения: Mur2Ac — N-ацетилмурамовая кислота, GlcNAc — N-ацетилглюкозамин, RO — остаток молочной кислоты, NAc и AcN — N-ацетильная группа.

На этих исследованиях интересно обсуждать развитие биохимической науки.

Субстратами лизоцима служат пептидогликаны — углеводы клеточных стенок многих бактерий (см. рис. 20-31). Лизоцим расщепляет $\beta 1 \rightarrow 4$ -гликозидную C—O связь (см. с. 348) между

двумя типами остатков сахара в молекуле: остатками N-ацетилмурамовой кислоты (Mur2Ac) и N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), которые часто обозначают как NAM и NAG (рис. 6-24, б) соответственно. Шесть чередующихся остатков этих сахаров в молекуле пептидогликана

а

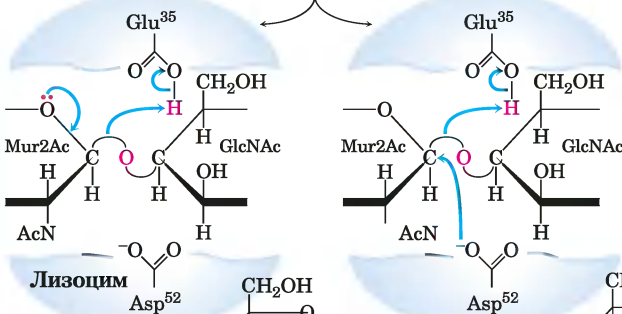
Пептидогликан связывается в активном центре лизоцима

Механизм S_N1

Механизм S_N2

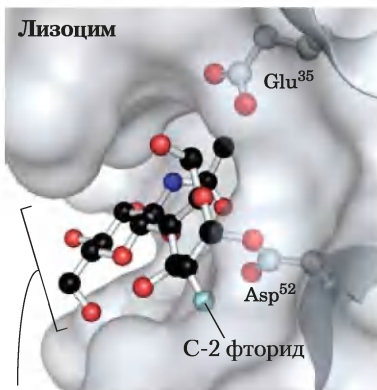
В результате перегруппировки образуется гликозильный карбокатион. По механизму общего кислотного катализа Glu^{35} протонирует замещаемый атом кислорода $GlcNAc$ и облегчает его уход.

Asp^{52} выступает как ковалентный катализатор, непосредственно вытесняя $GlcNAc$ по механизму S_N2 . Glu^{35} протонирует $GlcNAc$, что облегчает его уход.



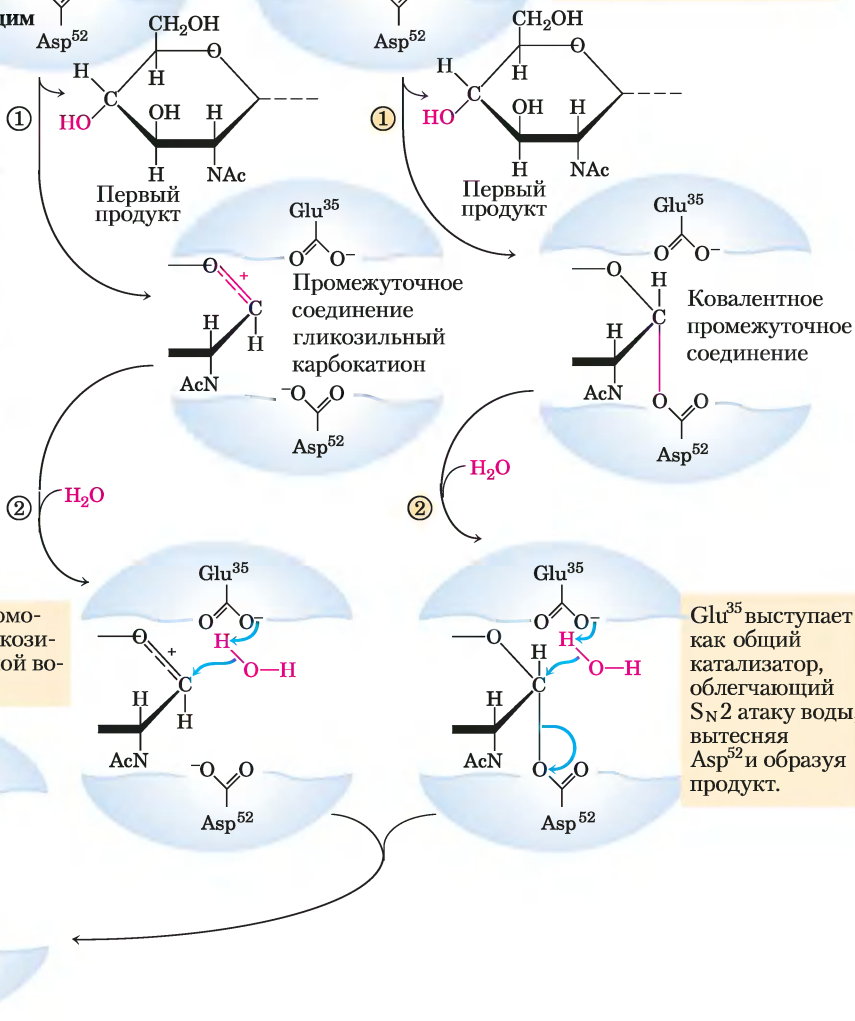
б

Лизоцим



Ковалентное промежуточное соединение связывается в активном центре.

Общий основной катализ с помощью Glu^{35} облегчает атаку гликозильного карбокатиона молекулой воды; образуется продукт.



Glu^{35} выступает как общий катализатор, облегчающий S_N2 атаку воды, вытесняя Asp^{52} и образуя продукт.

Второй продукт

Рис. 6-25. Механизм реакции. Действие лизоцима. В данной реакции вода присоединяется к атому C-1 Mur2Ac в составе продукта в той же конфигурации, что и исходная гликозидная связь. Таким образом, это реакция замещения с сохранением конфигурации. *а*) Два механизма, предложенные для описания данной реакции. Слева изображен предложенный Филлипсом механизм S_N1 -типа. Изображенный справа механизм S_N2 -типа лучше согласуется с современными экспериментальными данными. *б*) Поверхность активного центра лизоцима с шаростержневой моделью ковалентного фермент-субстратного промежуточного соединения. Боковые цепи в составе активного центра показаны как шаростержневые структуры, отходящие от ленточных структур (PDB ID 1H6M).

связываются в активном центре фермента в позициях, обозначаемых буквами от А до F. На модельных структурах показано, что боковая цепь N-ацетилмурамовой кислоты не позволяет этому остатку связываться в позициях С и Е, а только в В, D или F. При связывании пептидогликана расщепляется лишь одна гликозидная связь, соединяющая остаток N-ацетилмурамовой кислоты в положении D и остаток N-ацетилглюкозамина в положении E. Ключевыми аминокислотными остатками фермента являются Glu³⁵ и Asp⁵² (рис. 6-25, а). Реакция идет по механизму нуклеофильного замещения: OH-группа воды замещает остаток N-ацетилглюкозамина у C-1 атома N-ацетилмурамовой кислоты.

Казалось, что после идентификации аминокислотных остатков активного центра и детального изучения структуры белка в 1960-х гг. механизм действия лизоцима стал ясен. Однако окончательное понимание этого механизма пришло лишь почти через сорок лет. Существует два возможных пути протекания реакции, приводящих к образованию продуктов гидролиза гликозидной связи. Филлипс с сотрудниками предполагали, что реакция идет по диссоциативному S_N1-типу (рис. 6-25, а, слева), при котором GlcNAc сначала диссоциирует (стадия 1) с образованием карбокатионного интермедиата. В данной схеме уходящий GlcNAc протонируется в соответствии с механизмом общего кислотного катализа при участии Glu³⁵, расположенного в гидрофобном кармане, что сообщает его карбоксильной группе необычно высокое значение рK_a. Карбокатион стабилизируется в резонансной структуре с участием кислорода шестичленного кольца, а также электростатических взаимодействий с отрицательным зарядом на соседнем Asp⁵². На стадии 2 вода атакует атом C-1 Mur2Ac, в результате чего образуется продукт. Альтернативный механизм (рис. 6-25, а, справа) включает две последовательные стадии замещения S_N2-типа. На стадии 1 Asp⁵² атакует атом C-1 Mur2Ac и вытесняет GlcNAc. Как и в первом механизме, Glu³⁵ выступает в качестве общей кислоты и протонирует уходящий GlcNAc. На стадии 2 вода атакует атом C-1 Mur2Ac, что приводит к вытеснению Asp⁵² и образованию продукта.

S_N1-механизм, предложенный Филлипсом, признавался большинством исследователей на протяжении более трех десятилетий. Однако сохранялись некоторые противоречия, и работа в

данном направлении продолжалась. Методы анализа иногда развиваются слишком медленно, и бывает трудно поставить эксперимент, который бы прямо ответил на поставленный вопрос. Некоторые аргументы против гипотезы Филлипса ставили ее под сомнение, но не были особенно убедительны. Например, по оценкам, время полураспада гликозильного катиона должно было составлять 10⁻¹² с, т. е. больше, чем период молекулярного колебания, но этого времени недостаточно для диффузии других молекул. Еще более важно, что лизоцим является членом семейства ферментов, сохраняющих аномерную конфигурацию продукта такой же, какая была у субстрата (об аномерных конфигурациях углеводов см. гл. 7). Про все эти ферменты известно, что реакции с их участием протекают с образованием ковалентного промежуточного продукта, аналогичного тому, что мог бы возникать при альтернативном S_N2-механизме действия лизоцима. Таким образом, механизм Филлипса противоречил экспериментальным данным для близкородственных белков.

Эксперимент, проведенный Стефеном Уитерсом с сотрудниками в 2001 г., окончательно сдвинул чашу весов в пользу S_N2-механизма. Используя мутантный фермент (в котором Glu³⁵ был заменен Gln) и искусственный субстрат, что позволило снизить скорость ключевых стадий реакции, удалось стабилизировать ковалентное промежуточное соединение и изучить его методами масс-спектрометрии и рентгеновской кристаллографии (рис. 6-25, б).

Можно ли сказать, что механизм действия лизоцима доказан? Нет. Как говорил Альберт Эйнштейн, «никакое количество экспериментальных данных не может доказать, что данное утверждение верно, но всего лишь один эксперимент может доказать, что оно ошибочно». В случае механизма действия лизоцима кто-то может возразить (и уже возражали), что использование искусственных субстратов с атомами фтора у атомов C-1 и C-2, введенными для стабилизации ковалентного интермедиата, могло изменить путь реакции. Очень электроотрицательный фтор мог дестабилизировать и без того электронодефицитный карбениевый ион интермедиата, возникший при реализации S_N1-механизма. И тем не менее на сегодняшний день S_N2-механизм лучше описывает известные экспериментальные данные.

Понимание механизмов действия ферментов стимулирует развитие медицины

Большинство лекарств, применяемых для лечения различных болезней — от головной боли до ВИЧ-инфекции, представляют собой ингибиторы ферментов. Здесь мы рассмотрим два примера: антибиотик пенициллин (и его производные) и ингибиторы протеаз, используемые для лечения ВИЧ-инфекции; эти препараты являются необратимыми ингибиторами ферментов.

Пенициллин был открыт Александром Флемингом в 1928 г., но прошло еще 15 лет, прежде чем это сравнительно нестойкое вещество изучили настолько хорошо, что смогли использовать в качестве лекарства для лечения бактериальных инфекций. Пенициллин блокирует синтез пептидогликана (см. гл. 20; рис. 20-32) — основного компонента жесткой клеточной стенки бактерий, которая предохраняет их от осмотического лизиса. Пептидогликан образуется в результате перекрестного сшивания полисахаридов и пептидов при участии фермента транспептидазы (рис. 6-26). Именно эту реакцию ингибируют пенициллин и его аналоги (рис. 6-27, а), имитирующие участок D-Ala–D-Ala в последовательности предшественника пептидогликана. Вместо пептидной связи образуется реакционно-способный β -лактамный цикл. При связывании пенициллина с транспептидазой серин активного центра фермента атакует карбонильную группу β -лактамного кольца, в результате чего образуется ковалентный аддукт пенициллина и фермента.

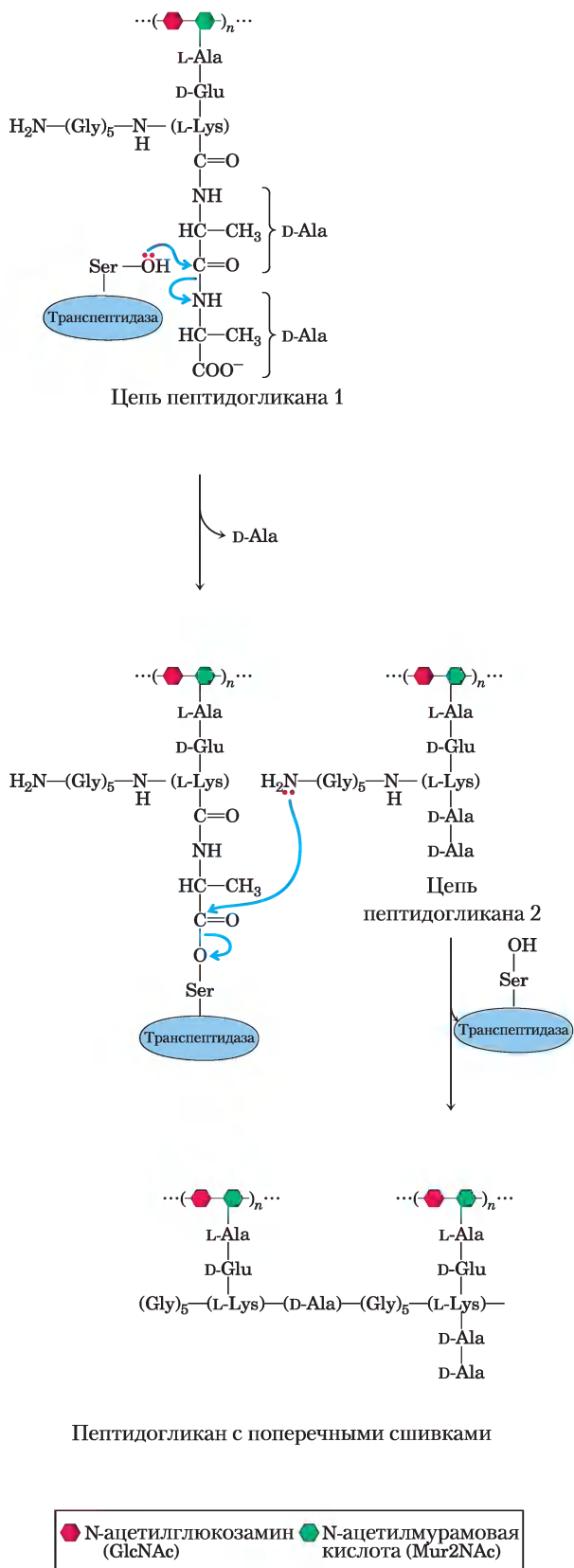
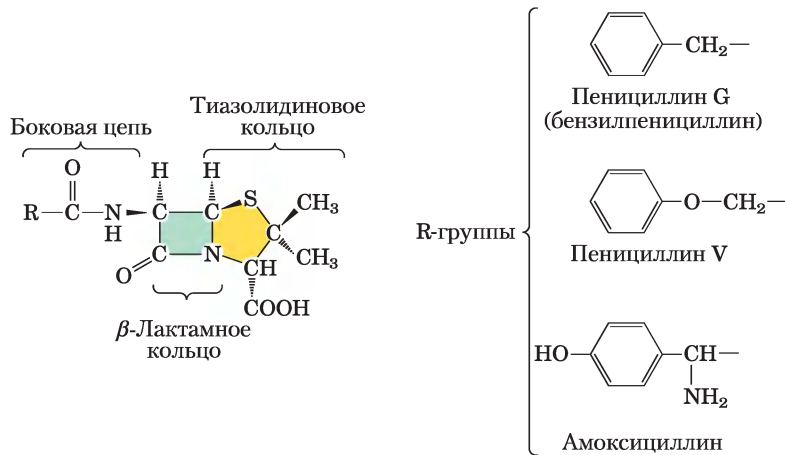
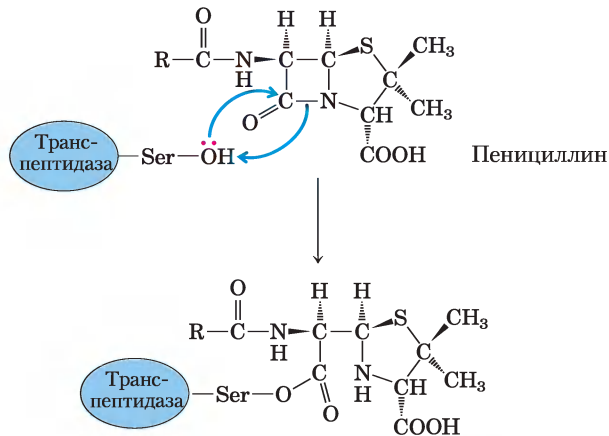


Рис. 6-26. Реакция, катализируемая транспептидазой.

Реакция связывания двух предшественников в более крупную полимерную молекулу пептидогликана происходит при участии остатка серина активного центра фермента в соответствии с механизмом ковалентного катализа, напоминающим механизм реакции, катализируемой химотрипсином. Интересно, что пептидогликан — одно из немногих природных соединений, в которых обнаружены остатки D-аминокислот. Серин активного центра атакует карбонильную группу пептидной связи между двумя остатками D-Ala, образуя сложноэфирную связь между субстратом и ферментом и высвобождая концевой остаток D-Ala. Далее аминогруппа второго предшественника атакует сложноэфирную связь, вытесняя фермент и сшивая тем самым два предшественника.



Стандартная структура пенициллинов

a

Стабильное производное,
неактивная транспептидаза

б

Рис. 6-27. Ингибирование транспептидазы β -лактамными антибиотиками. а) В β -лактамных антибиотиках пятичленный тиазолидиновый цикл образует конденсированную систему с четырехчленным β -лактамным кольцом. Последнее является напряженной структурой и содержит амидный азот, играющий важнейшую роль в остановке синтеза пептидогликана. В различных пенициллинах R-группа разная. Пенициллин G был выделен первым и до сих пор остается наиболее эффективным, однако он разрушается под действием желудочного сока, поэтому его вводят в организм путем инъекций. Пенициллин V почти так же активен и не разрушается в кислых условиях, поэтому его можно принимать перорально. Амоксициллин эффективен при широком спектре заболеваний, его можно принимать перорально, и поэтому его назначают наиболее часто из всех β -лактамных антибиотиков. б) Атака остатка Ser активного центра транспептидазы на амидную группу β -лактамного кольца приводит к образованию ацилированного фермента. Гидролиз этого соединения происходит настолько медленно, что реакция образования аддукта практически необратима, и транспептидаза остается в неактивной форме.

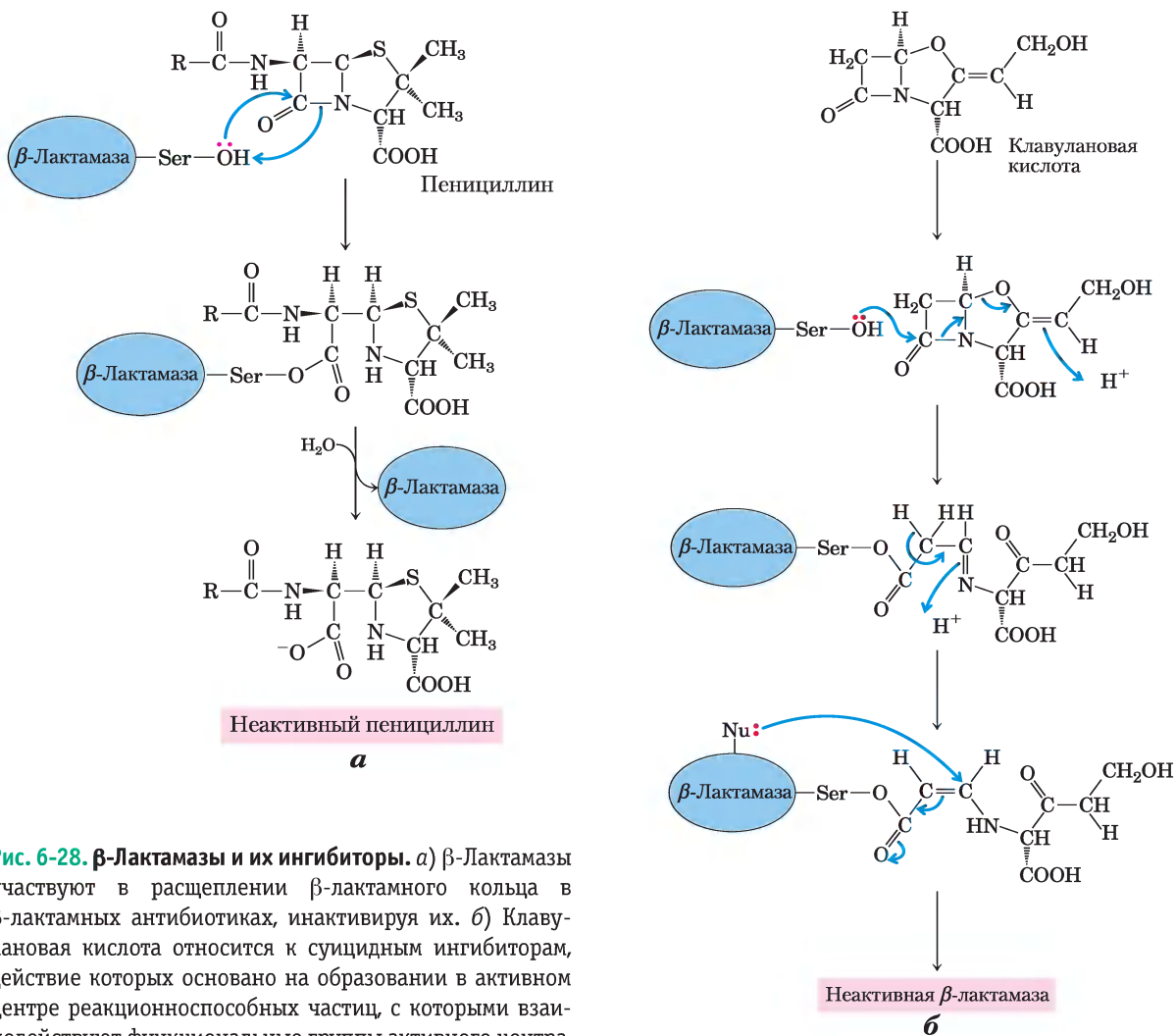


Рис. 6-28. β -Лактамазы и их ингибиторы. а) β -Лактамазы участвуют в расщеплении β -лактамного кольца в β -лактамных антибиотиках, инактивируя их. б) Клавулановая кислота относится к суицидным ингибиторам, действие которых основано на образовании в активном центре реакционноспособных частиц, с которыми взаимодействуют функциональные группы активного центра, что приводит к необратимому ацилированию фермента.

Однако уходящая группа остается связанной с остатком β -лактамного кольца (рис. 6-27, б). Данный ковалентный комплекс необратимо инактивирует фермент. А это, в свою очередь, блокирует синтез клеточной стенки бактерии, и большинство бактерий погибают, поскольку их хрупкая внутренняя мембрана прорывается в результате осмотического шока.

Активное применение в медицине пеницилина и его производных привело к эволюции штаммов патогенных бактерий, которые начали синтезировать β -лактамазы (рис. 6-28, а) — ферменты, которые расщепляют и тем самым

инактивируют β -лактамные антибиотики. В результате бактерии стали устойчивыми к действию антибиотиков этого класса. Гены этих ферментов быстро распространяются в популяции бактерий в условиях селективного давления, вызванного использованием (иногда чрезмерным) β -лактамных антибиотиков. На появление β -лактамаз фармацевты ответили созданием таких соединений, как клавулановая кислота — суицидный ингибитор, необратимо инактивирующий β -лактамазы (рис. 6-28, б). По структуре клавулановая кислота напоминает β -лактамный антибиотик, и поэтому она образует ковалент-

ный аддукт с остатком серина в активном центре β -лактамазы. Это приводит к определенным перестройкам и к образованию гораздо более реакционноспособного производного, которое затем подвергается атаке другим нуклеофилом активного центра, что приводит к необратимому ацилированию фермента и его инактивации. Широко применяемый лекарственный препарат АугментинTM представляет собой комбинацию амоксициллина и клавулановой кислоты. «Химическая война» между человеком и бактериями продолжается. Были обнаружены штаммы болезнетворных бактерий, устойчивых как к амоксициллину, так и к клавулановой кислоте (это означает, что в гене β -лактамазы произошли мутации, предотвращающие ее взаимодействие с клавулановой кислотой). По всей видимости, в ближайшем будущем поиск новых антибиотиков будет развиваться еще активнее.

Антивирусные препараты — еще один пример современных лекарственных средств. Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является причиной синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). По оценкам, в 2005 г. от 37 до 45 млн человек были носителями вируса, причем ежегодно заражается от 3,9 до 6,6 млн человек, а умирает более 2,4 млн. Впервые о СПИДе как об эпидемии заговорили в 1980-х гг. Вскоре

был открыт вирус иммунодефицита, относящийся к группе **ретровирусов**. В геноме ретровирусов содержится РНК, а фермент обратная транскриптаза способен на основе РНК синтезировать комплементарную последовательность ДНК. Понимание механизмов действия ВИЧ и разработка методов лечения инфекции основываются на результатах многолетних научных исследований, проводившихся на других ретровирусах. Такой ретровирус, как ВИЧ, имеет сравнительно простой жизненный цикл (см. рис. 26-33). Его геномная РНК конвертируется в двойную спираль ДНК под действием обратной транскриптазы (см. гл. 26). Затем двухцепочечная ДНК встраивается в хромосому в ядре клетки хозяина при помощи фермента интегразы (см. гл. 25). Интегрированная копия вирусного генома может находиться в неактивном состоянии бесконечно долго. Но она также может транскрибироваться обратно в РНК, которая затем транслируется в белки, использующиеся для строительства новых вирусных частиц. Большая часть вирусных генов транслируется в длинные полипротеины, которые расщепляются протеазой ВИЧ на отдельные белки, необходимые для сборки вируса (см. рис. 26-34). В данном цикле принимают участие всего три важных фермента: обратная транскриптаза, интегразы и протеазы, и

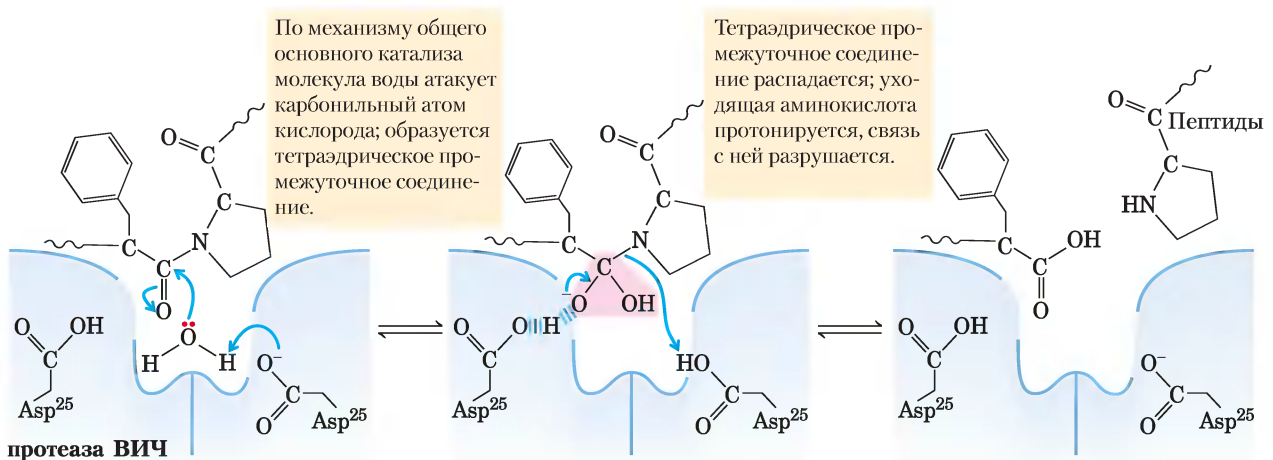
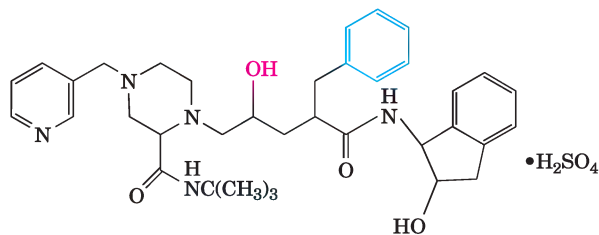


Рис. 6-29. Механизм действия протеазы ВИЧ. Два остатка Asp активного центра (из разных субъединиц) действуют в качестве общих кислотно-основных катализаторов, облегчая атаку воды на пептидную связь. Неустойчивое тетраэдрическое промежуточное соединение, возникающее в ходе реакции, выделено розовым цветом.

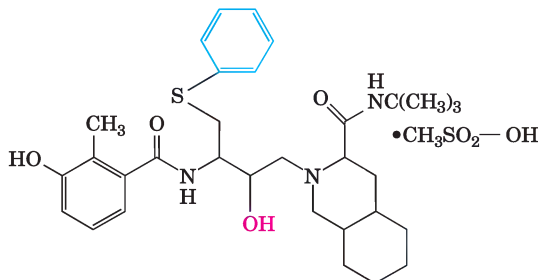
каждый из этих ферментов может служить мишенью лекарственных препаратов.

Существуют четыре основных подкласса протеаз. Сериновые протеиназы, такие как химо-трипсин и трипсин, и цистеиновые протеиназы (в которых Cys играет почти такую же роль в катализе, как и Ser) образуют ковалентные фермент-субстратные комплексы, а аспартильные протеиназы и металлопротеиназы таких комплексов не образуют. Протеаза ВИЧ относится к аспартильным протеиназам. Два остатка Asp в активном центре облегчают атаку молекулы воды на расщепляемую пептидную связь (рис. 6-29). При этом сначала образуется неустойчивое тетраэдрическое соединение, аналогичное тому, что мы видели в реакции химо-трипсина. Это производное по структуре и энергетическому состоянию близко к переходному состоянию. Лекарственные препараты на основе ингибиторов протеазы ВИЧ образуют нековалентные комплексы с ферментом, но связываются с ним настолько прочно, что их можно рассматривать в качестве необратимых ингибиторов. Прочность связывания частично объясняется тем, что эти вещества представляют собой аналоги переходного состояния (см. доп. 6-3). Мы указываем на этот факт, чтобы еще раз подчеркнуть, что обсуждаемые в настоящей главе принципы катализа не абстрактные идеи. Внедрение этих принципов в медицинскую практику спасает жизнь людям.

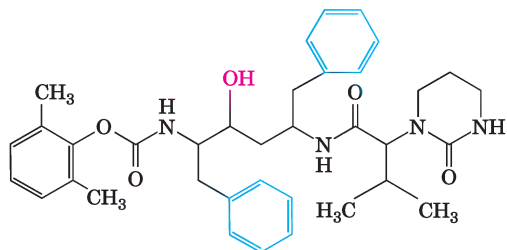
Протеаза ВИЧ наиболее эффективно расщепляет пептидные связи между остатками Phe и Pro. Активный центр фермента содержит карман, в котором может разместиться соседняя с расщепляемой связью ароматическая группа. Структура нескольких ингибиторов протеаз ВИЧ представлена на рис. 6-30. Эти структуры кажутся различными, но у них есть общий элемент — гидроксильная группа в основной цепи, расположенная по соседству с боковой цепью и на некотором удалении — бензольное кольцо. Благодаря такому строению бензольное кольцо легко укладывается в карман для связывания ароматических групп. Соседняя гидроксильная группа похожа на отрицательно заряженный кислород в тетраэдрическом промежуточном продукте нормальной реакции, в результате чего фермент «ошибается» и образуется аналог переходного состояния. Остальная часть молекулы у любого из этих ингибиторов построена таким образом, чтобы максимально соответствовать по форме тем



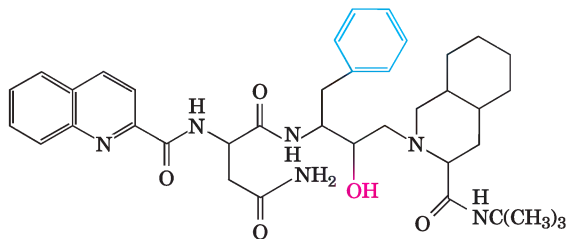
Индинавир



Нелфинавир



Лопинавир



Саквинавир

Рис. 6-30. Ингибиторы протеазы ВИЧ. Гидроксильная группа (выделена красным) похожа на атом кислорода в тетраэдрическом промежуточном продукте, образуется аналог переходного состояния. Соседнее бензольное кольцо (синее) помогает лекарству правильно расположиться в активном центре фермента.

углублениям, которые имеются на поверхности фермента, дополнительно усиливая связывание.

Создание подобных препаратов значительно увеличило продолжительность и улучшило качество жизни миллионов пораженных СПИДом людей. ■

Краткое содержание раздела 6.4

ПРИМЕРЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- Химотрипсин — это сериновая протеаза, механизм действия которой хорошо изучен. Этот механизм включает стадии общего кислотного катализа, ковалентного катализа и стабилизацию переходного состояния.
- Действие гексокиназы — прекрасный пример того, как при индуцированном соответствии используется энергия связывания субстрата.
- Реакция, катализируемая енолазой, — пример катализа с участием ионов металлов.
- Действие лизоцима основано на ковалентном и общем основном катализе и осуществляется в двух последовательных реакциях нуклеофильного замещения.
- Понимание механизма действия ферментов позволяет создавать лекарства на основе ингибиторов этих ферментов.

6.5. Регуляторные ферменты

В клетке группы ферментов действуют сообща, осуществляя последовательные реакции определенного метаболического процесса, например многостадийного расщепления глюкозы до лактата или многостадийного синтеза аминокислот из простых молекул. В подобных ферментативных системах продукт одной каталитической реакции служит субстратом для другой.

Большинство ферментов метаболических путей (циклов) подчиняются тем кинетическим закономерностям, которые мы обсуждали выше. Однако в каждом метаболическом цикле действует один или несколько ферментов, которые оказывают наибольшее влияние на скорость всего процесса. Эти **регуляторные ферменты** способны повышать и снижать свою каталитическую активность в ответ на определенные сигналы. Изменение скорости реакции, катализируемой регуляторным ферментом, а следовательно, скорости всего метаболического пути позволяет клетке адаптироваться к

изменяющимся потребностям в энергии и биомолекулах, необходимых для роста и репарации.

В большинстве полиферментных систем регуляторные функции выполняет первый фермент в реакционной цепочке. Это очень удобно для регуляции всего метаболического пути, поскольку катализ даже нескольких первых стадий, приводящих к образованию ненужного в данный момент продукта, отнимает энергию и метаболиты от более важных процессов. Другие ферменты метаболического пути могут играть почти незаметные на первый взгляд роли в регуляции потока через метаболический путь, как описано в гл. 15.

Активность регуляторных ферментов модулируется самыми разнообразными способами. **Аллостерические ферменты** действуют через обратимое нековалентное связывание регуляторных молекул, называемых **аллостерическими модуляторами**, или **аллостерическими эффекторами**; обычно это небольшие метаболиты или кофакторы. Другие ферменты регулируются путем обратной **ковалентной модификации**. В обоих случаях регуляторные белки обычно состоят из субъединиц, причем иногда регуляторные участки и активные центры расположены на разных субъединицах. Метаболические процессы имеют, по крайней мере, еще два механизма регуляции ферментов. Активность некоторых ферментов может стимулироваться или ингибироваться при связывании с другими регуляторными белками. Другие ферменты активируются при протеолитическом отщеплении пептидного фрагмента; в отличие от регуляции эффекторами протеолитическое расщепление необратимо. Оба механизма реализуются в таких физиологических процессах, как пищеварение, свертывание крови, гормональная активность и зрение.

Рост и выживание клетки зависят от эффективности использования энергии и питательных веществ, что определяется действием регуляторных ферментов. Не существует общего правила, определяющего, какой тип регуляции выполняется в той или иной системе. Аллостерические (нековалентные) механизмы позволяют тонко регулировать метаболические пути, осуществление которых необходимо постоянно, но с разным уровнем активности в зависимости от клеточных условий. Регуляция путем ковалент-

ной модификации может осуществляться как по принципу «все или ничего» (в случае протектолитического расщепления), так и приводить к тонким изменениям активности. Один регуляторный фермент может использовать несколько типов регуляции. Заключительный раздел данной главы посвящен этим методам ферментативной регуляции.

Аллостерические ферменты претерпевают конформационные изменения в ответ на связывание модулятора

Как обсуждалось в гл. 5, аллостерическими белками называют те, у которых есть «другая форма» или конформация, в которую они переходят при связывании модулятора. То же относится и к некоторым регуляторным ферментам: конформационные изменения, вызванные одним или несколькими модуляторами, соответствуют взаим-

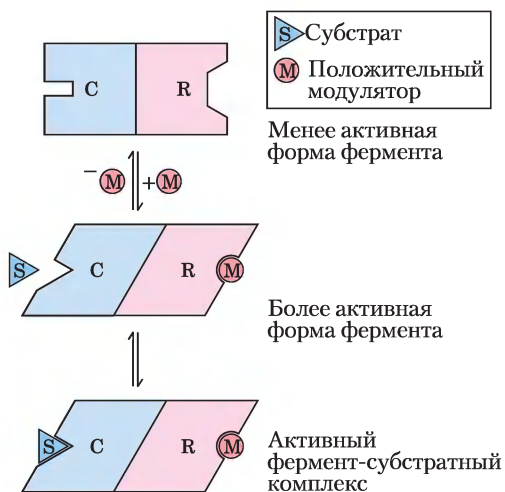


Рис. 6-31. Модель взаимодействия между субъединицами аллостерического белка, а также с ингибитором и активатором. Во многих аллостерических ферментах центры связывания субстрата и модулятора (модуляторов) находятся на разных субъединицах — каталитической (C) и регуляторной (R) соответственно. Связывание положительного (активирующего) модулятора (M) в специфическом центре связывания на регуляторной субъединице приводит к конформационным изменениям в каталитической субъединице. В результате этих изменений каталитическая субъединица активируется и способна связывать субстрат (S) с более высоким сродством. При диссоциации модулятора из регуляторного центра фермент возвращается в менее активное состояние.

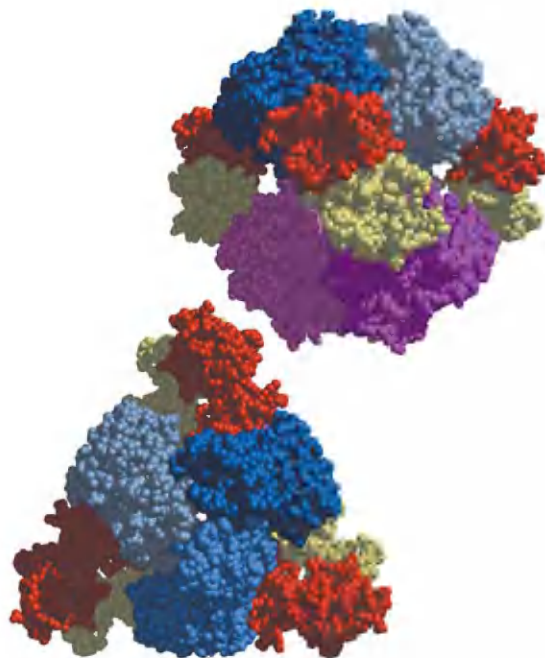


Рис. 6-32. Модель регуляторного фермента аспартат-транскарбамоилазы; разные проекции (PDB ID 2AT2). Данный аллостерический фермент имеет два каталитических кластера, каждый из которых состоит из трех каталитических полипептидных цепей (разные оттенки синего и розового), и три регуляторных кластера, каждый из двух регуляторных полипептидных цепей (красные и желтые). Регуляторные кластеры расположены в углах треугольника, окружающего каталитические субъединицы. Центры связывания аллостерических модуляторов находятся на регуляторных субъединицах. Связывание модулятора приводит к сильным изменениям структуры и активности фермента. Роль данного белка в синтезе нуклеотидов и детали его регуляции обсуждаются в гл. 22.

ным превращениям менее и более активных форм фермента. Модуляторы аллостерических ферментов могут оказывать ингибирующее или стимулирующее действие. Часто в качестве модулятора выступает сам субстрат; регуляторные ферменты, чьи субстраты одновременно являются регуляторами, называют *гомotropными ферментами*. Здесь наблюдается эффект, сходный со связыванием кислорода с гемоглобином (гл. 5): связывание лиганда (для фермента лигандом служит субстрат) приводит к конформационным изменениям, которые, в свою очередь, влияют на активность в остальных участках белка. Если функцию субстрата и модулятора фермен-

та выполняют разные молекулы, такой фермент называют *гетеротропным*. Заметьте, что аллостерические модуляторы не следует путать с ингибиторами, действующими по бесконкурентному или смешанному механизму. Хотя последние связываются вне активного центра фермента, они необязательно приводят к конформационным изменениям, сопровождающимся переходами между активной и неактивной формами фермента; кроме того, кинетические проявления этих эффектов также различны.

Свойства аллостерических ферментов сильно отличаются от свойств нерегуляторных ферментов. Некоторые различия наблюдаются на уровне структуры белков. Кроме активного центра аллостерические ферменты обычно имеют один или несколько регуляторных (аллостерических) центров для связывания модулятора (рис. 6-31). Так же как активный центр фермента специфичен для определенного субстрата, каждый регуляторный центр специфичен для определенного модулятора. Ферменты с несколькими модуляторами обычно имеют отдельный участок для связывания каждого из них. У гомотропных ферментов активный центр и регуляторный центр совпадают.

Аллостерические ферменты, как правило, больше по размеру и сложнее устроены, чем обычные. Большинство аллостерических ферментов состоит из двух или более субъединиц. Аспаргат-транскарбамоилаза, катализирующая реакцию на ранних этапах биосинтеза пиримидиновых оснований (рис. 22-36), состоит из 12 полипептидных цепей, образующих каталитические и регуляторные субъединицы. На рис. 6-32 представлена четвертичная структура данного белка, полученная с помощью рентгеноструктурного анализа.

Во многих метаболических путях регуляторная стадия катализируется аллостерическим ферментом

В некоторых полиферментных системах происходит специфическое ингибирование регуляторных ферментов конечным продуктом метаболического пути всякий раз, когда содержание этого продукта превышает необходимый клетке уровень. При замедлении реакции, катализируемой регуляторным ферментом, все последующие ферментативные стадии также замедляются по мере истощения их субстратов. В результате

скорость образования конечного продукта данного метаболического пути приходит в соответствие с клеточными нуждами. Данный тип регуляции называется **ингибированием по принципу обратной связи**. Накопление конечного продукта метаболического пути замедляет все реакции этого пути.

Одной из первых систем, где был обнаружен такой механизм, является бактериальная ферментативная система, катализирующая пятиступенчатое превращение L-треонина в L-изолейцин (рис. 6-33). Первый фермент, действующий в

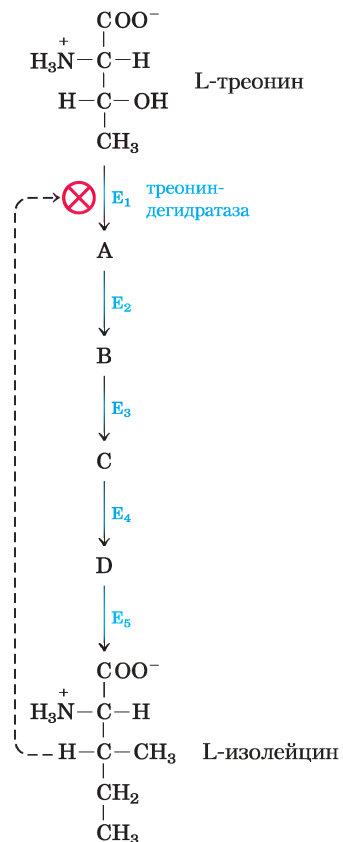


Рис. 6-33. Ингибирование по принципу обратной связи. Превращение L-треонина в L-изолейцин происходит в результате последовательного действия пяти ферментов (от E_1 до E_5). Первый фермент треониндегидратаза подвергается аллостерическому ингибированию продуктом последней реакции этого пути (изолейцином), но не ингибируется никаким другим промежуточным продуктом (от A до D). Ингибирование по принципу обратной связи изображено пунктирной линией и символом \otimes у стрелки, соответствующей реакции, катализируемой треониндегидратазой. Такой способ изображения обратной связи используется в книге и далее.

данной системе, а именно треониндегидратаза, ингибируется изолейцином — продуктом последней реакции в этой реакционной цепи. Это пример гетеротропного аллостерического ингибирования. Изолейцин — довольно специфический ингибитор. Ни один из промежуточных продуктов в этой реакционной цепи не ингибирует треониндегидратазу, и никакой другой фермент в цепочке не ингибируется изолейцином. Изолейцин связывается не в активном центре, а в другой области молекулы фермента — в регуляторном центре. Это связывание является нековалентным и обратимым; если концентрация изолейцина снижается, скорость дегидратации треонина увеличивается. Так активность треониндегидратазы быстро и обратимо реагирует на флуктуации концентрации изолейцина в клетке. Как мы увидим в части II данной книги, механизмы регуляции многих других метаболических путей гораздо сложнее.

Поведение аллостерических ферментов отклоняется от кинетики Михаэлиса–Ментен

Для аллостерических ферментов зависимость между v_0 и $[S]$ не подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен. Для этих ферментов также наблюдается насыщение субстратом при достаточно высоких концентрациях субстрата $[S]$, однако график v_0 от $[S]$ (рис. 6-34) имеет S -образный, а не гиперболический вид, характерный для нерегуляторных ферментов. На S -образной кривой можно найти концентрацию $[S]$, соответствующую $1/2 V_{\max}$, но, поскольку фермент не подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен, это не K_M . Для аллостерических ферментов используют обозначения $[S]_{0,5}$ или $K_{0,5}$; при этой концентрации их субстрата достигается половина максимальной скорости реакции (рис. 6-34).

S -образная зависимость v_0 от $[S]$ обычно говорит о кооперативном взаимодействии между субъединицами белка. Другими словами, изменение структуры одной субъединицы из-за нековалентных взаимодействий в месте контакта субъединиц приводит к структурным изменениям в соседней субъединице. Этот принцип особенно наглядно проявляется, если белок не является ферментом, например при связывании гемоглобина с кислородом. S -образную за-

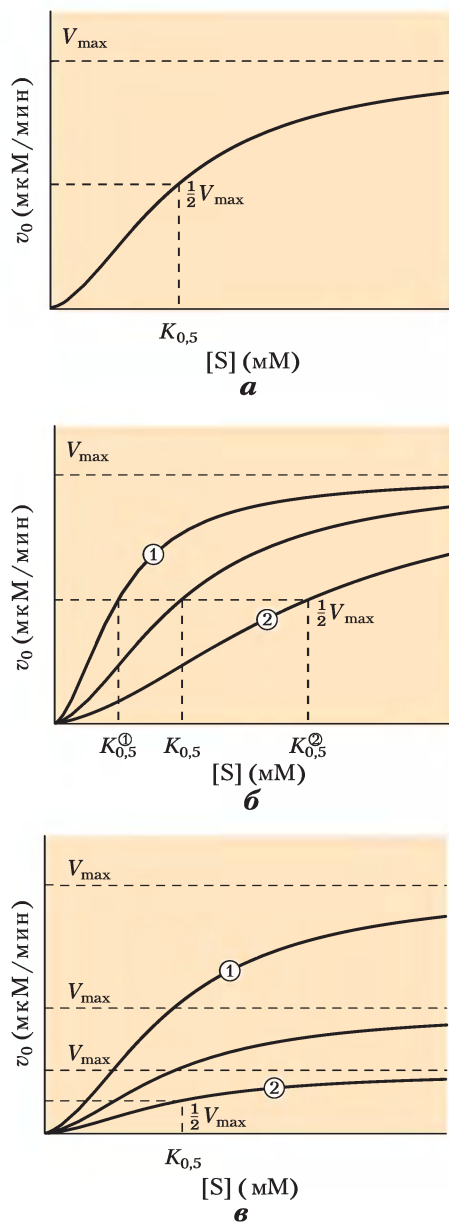


Рис. 6-34. Зависимость активности различных аллостерических ферментов от концентрации субстрата. Здесь представлены примеры сложных ответных реакций аллостерических ферментов на действие их модуляторов. а) Сигмоидная зависимость для гомотропного фермента, для которого субстрат является одновременно и положительным (активирующим) модулятором. Обратите внимание на сходство с кривой насыщения гемоглобина кислородом (рис. 5-12). б) Влияние положительного (+) и отрицательного (–) модуляторов на поведение аллостерических ферментов: $K_{0,5}$ меняется, V_{\max} остается на прежнем уровне. Средняя кривая получена без модулятора. в) Менее распространенное действие модулятора — V_{\max} изменяется сильно, а $K_{0,5}$ практически постоянна.

висимость можно объяснить с помощью двух моделей (симметричной и последовательной), описывающих взаимодействие между субъединицами (рис. 5-15).

Гомотропные аллостерические ферменты, как правило, состоят из нескольких субъединиц. Как уже упоминалось ранее, центр связывания на каждой субъединице такого белка выполняет одновременно функции активного и регуляторного центров. Чаще субстрат действует как положительный модулятор (активатор), поскольку субъединицы фермента действуют кооперативно: связывание одной молекулы субстрата в одном центре влечет за собой изменение конформации белка, что способствует связыванию следующих молекул субстрата. Такой тип взаимодействия как раз и приводит к *S*-образной зависимости v_0 от $[S]$. Особенность *S*-образной зависимости заключается в том, что небольшие изменения концентрации модулятора могут сильно повлиять на активность фермента. Как видно из рис. 6-34, *a*, на крутом участке кривой сравнительно небольшое увеличение концентрации субстрата $[S]$ вызывает значительное повышение v_0 .

В случае гетеротропных аллостерических ферментов модуляторами являются другие метаболиты, а не их субстрат, поэтому форма зависимости v_0 от $[S]$ может быть различной. Действие активатора может приводить к почти гиперболической зависимости, причем $K_{0,5}$ ниже, а V_{\max} такая же, таким образом при любой фиксированной концентрации субстрата (а для всех $[S]$ v_0 выше; см. рис. 6-34, *b*, кривая 1) скорость реакции растет по сравнению с контрольной реакцией без модулятора. Другие гетеротропные аллостерические ферменты реагируют на действие активатора повышением V_{\max} без значительных изменений $K_{0,5}$ (рис. 6-34, *в*). Действие отрицательного модулятора (ингибитора) может приводить к более выраженной сигмоидной кривой, для которой $K_{0,5}$ выше, чем без модулятора (рис. 6-34, *б*, кривая 2). Таким образом, зависимость активности гетеротропных аллостерических ферментов от концентрации субстрата может различным образом изменяться под действием модулятора, поскольку некоторые из этих ферментов регулируются ингибиторами, другие — активаторами, а третьи — теми и другими.

Регуляция некоторых ферментов происходит путем обратимой ковалентной модификации

Активность других важных регуляторных ферментов изменяется путем ковалентной модификации одного или нескольких аминокислотных остатков в их молекулах. Описано более 500 различных способов ковалентной модификации белков. В роли модифицирующих групп чаще всего выступают фосфорильная, ацетильная, аденильная, уридилная, метильная, амидная, карбоксильная, миристоильная, пальмитоильная, пренильная, гидроксильная, сульфатная и ADP-рибозильная группы (рис. 6-35). Существуют даже белковые молекулы, которые используются как специальные модифицирующие группы, например убиквитин и белки SUMO (*small ubiquitin-like modifiers*). Модифицирующие группы обычно присоединяются к молекуле регуляторного белка и снимаются с нее под действием разных ферментов.

При модификации аминокислотных остатков на место одной аминокислоты встраивают другую — с другими свойствами. Введение заряженной группы может иметь локальное влияние — изменить свойства фермента или его конформацию. Введение гидрофобной группы может привести к связыванию белка с мембраной. Изменения часто бывают весьма существенными и могут оказаться критическими для функционирования измененного фермента.

Число возможных модификаций ферментов слишком велико, чтобы обсуждать их все подробно. Рассмотрим лишь несколько примеров.

Примером фермента, активность которого регулируется метилированием, может служить метил-акцентирующий белок хемотаксиса бактерий. Этот белок является частью системы, позволяющей бактерии в растворе приближаться к аттрактантам (например, сахару) и удаляться от репеллентов. Как метилирующий агент выступает *S*-аденозилметионин (adoMet) (рис. 18-18, *б*). Ацетилирование — довольно частая модификация, которой подвергаются около 80% всех растворимых белков эукариот, включая многие ферменты, которые ацетируются по N-концу. Убиквитин присоединяется к белкам в качестве «ярлыка», указывая на то, что эти белки направляются на протеолитическое расщепление (см. рис. 27-47). Убиквитинирование может также выполнять

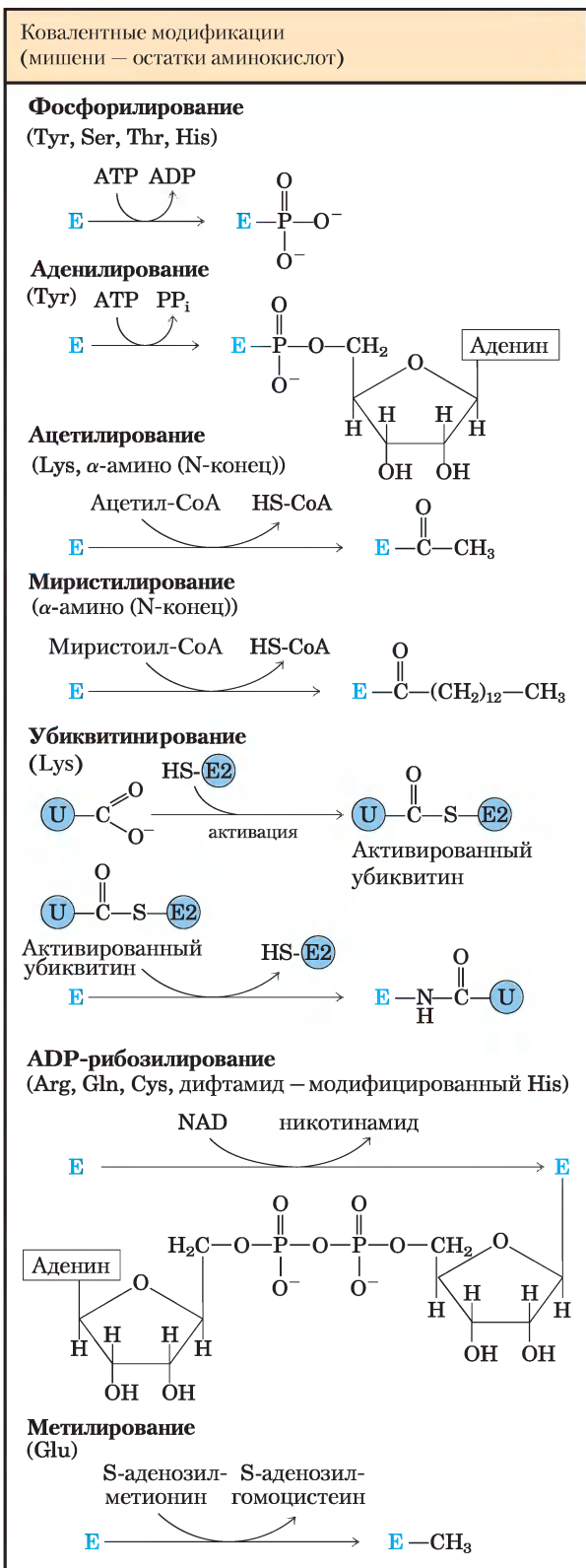


Рис. 6-35. Примеры реакций модификации ферментов (E — фермент).

регуляторную функцию. Белки SUMO присоединяются ко многим ядерным белкам эукариот и участвуют в регуляции транскрипции, организации хроматина и репарации ДНК.

Очень интересная реакция ADP-рибозилирование, которой подвергаются лишь немногие белки. ADP-рибоза является производным никотинамидадениннуклеотида (NAD) (рис. 8-39). Такой модификации подвергается бактериальная редуктаза нитрогеназы, играющая важную роль в фиксации азота. Дифтерийный и холерный токсины представляют собой ферменты, катализирующие ADP-рибозилирование и приводящие к инактивации ключевых клеточных ферментов и белков.

Вероятно, самой важной регуляторной модификацией является фосфорилирование. По оценкам, треть всех белков в клетках эукариот фосфорилированы, а одна или (часто) несколько стадий фосфорилирования осуществляются практически в каждом регуляторном процессе. В некоторых белках фосфорилирован лишь один остаток, в других — несколько, но есть белки, в которых имеются десятки фосфорилированных центров. Данный способ ковалентной модификации играет важнейшую роль во многих регуляторных путях, поэтому мы остановимся на нем подробнее и снова вернемся в гл. 12.

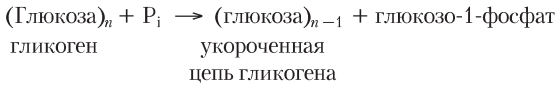
Все эти способы модификации белков обсуждаются в последующих главах книги.

Фосфорилирование влияет на структуру и каталитическую активность белков

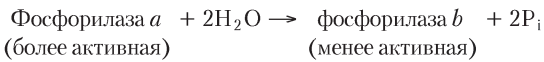
Присоединение фосфорильной группы к аминокислотным остаткам белка осуществляют **протеинкиназы**; удаление фосфорильной группы — **фосфатазы**. Присоединение фосфорильной группы к остаткам Ser, Thr и Tyr приводит к внедрению громоздких заряженных групп в слабополярные области белка. Атомы кислорода фосфорильной группы могут участвовать в образовании водородной связи с функциональными группами белка, чаще всего с амидными группами пептидной цепи в начале α-спирального участка или с заряженной гуанидиновой группой остатка Arg. Два отрицательных заряда на фосфорилированной боковой цепи могут приводить к отталкиванию расположенных поблизости отрицательно заряженных остатков (Asp и Glu). Если модифицированная

боковая цепь локализована в участке белка, который важен для образования его трехмерной структуры, фосфорилирование может оказывать серьезное влияние на конформацию белка и, следовательно, на связывание субстрата и катализ.

Важным примером регуляции через фосфорилирование является катализ гликогенфосфоорилазой ($M_r = 94\,500$) следующей реакции в мышцах и печени (гл. 15):

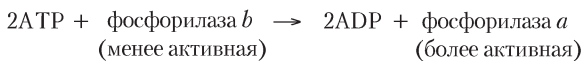


Образующийся глюкозо-1-фосфат может использоваться для синтеза АТФ в мышцах или превращаться в свободную глюкозу в печени. Гликогенфосфоорилаза существует в двух формах — более активная фосфоорилаза *a* и менее активная фосфоорилаза *b* (рис. 6-36). Фосфоорилаза *a* состоит из двух субъединиц, каждая из которых имеет специфический остаток Ser, подвергающийся фосфорилированию по гидроксильной группе. Фосфорилирование остатка серина необходимо для проявления максимальной активности фермента. Фосфорильные группы могут быть удалены действием другого фермента — фосфатазы фосфоорилазы:



Согласно данной схеме, фосфоорилаза *a* превращается в фосфоорилазу *b* путем расщепления ковалентных связей между остатками фосфорной кислоты и двумя специфическими остатками серина на двух субъединицах гликогенфосфоорилазы.

Фосфоорилаза *b*, в свою очередь, также может быть снова превращена в активную фосфоорилазу *a* под действием другого фермента — киназы фосфоорилазы, катализирующей перенос фосфорильной группы от АТФ на гидроксильную группу специфических остатков серина в фосфоорилазе *b*:



Распад гликогена в скелетных мышцах и печени регулируется путем изменения соотношения двух форм гликогенфосфоорилазы. Формы *a* и *b* различаются вторичной, третичной и четвертичной структурами; их взаимопревращения сопровожда-

ются изменениями структуры активного центра и, следовательно, каталитической активности.

Регулирование гликогенфосфоорилазы фосфорилированием иллюстрирует влияние модификации как на структуру, так и на каталитическую активность фермента. Каждая субъединица нефосфорилированного белка упакована таким образом, что 20 аминокислотных остатков на N-конце (в их числе несколько основных остатков) располагаются в области, содержащей кислые аминокислотные остатки. Возникающее электростатическое притяжение стабилизирует молекулу. Фосфорилирование Ser¹⁴ нарушает это взаимодействие и выталкивает N-концевой домен из кислой области белка, что приводит к возникновению конформации, способствующей взаимодействию между P-Ser и боковыми цепями нескольких остатков Arg. В данной конформации белок гораздо более активен.

Фосфорилирование фермента может влиять на катализ и другим путем, а именно изменяя сродство фермента к субстрату. Например, при фосфорилировании изоцитратдегидрогеназы (фермент цикла лимонной кислоты, гл. 16) электростатическое отталкивание фосфатных групп ингибирует связывание цитрата (трикарбоновой кислоты) в активном центре фермента.

Множественное фосфорилирование позволяет осуществлять тонкую регуляцию

Остатки Ser, Thr и Tyr, подвергающиеся фосфорилированию в регуляторных белках, встречаются в распространенных структурных мотивах, которые называются *консенсусными последовательностями* и узнаются специфическими протеинкиназами (табл. 6-10). Некоторые киназы предпочитают фосфорилировать остатки, находящиеся по соседству от основных аминокислот; другие фосфорилируют те остатки, что расположены, например, рядом с остатком Pro. Однако аминокислотная последовательность — это не единственный фактор, определяющий, будет ли данный остаток фосфорилирован. В результате фолдинга белка остатки, расположенные далеко друг от друга в первичной структуре, могут оказаться рядом; именно трехмерная структура белка определяет, доступен ли остаток для протеинкиназы и воспринимает ли она его в качестве субстрата. Еще одним фактором, влияющим на субстратную специфичность

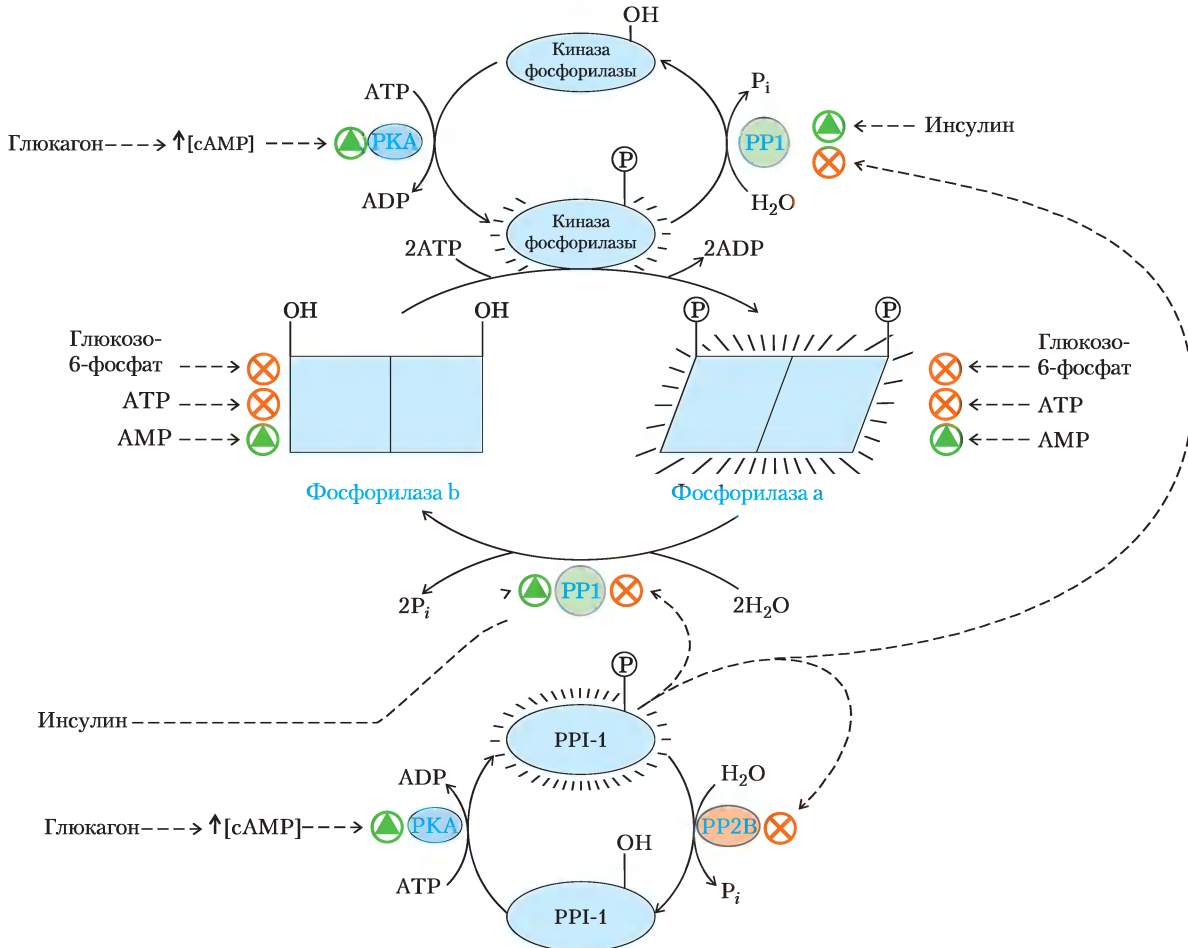


Рис. 6-36. Регуляция активности гликогенфосфорилазы мышц путем ковалентной модификации. Регуляция активности гликогенфосфорилазы мышц осуществляется несколькими путями, включая ковалентную модификацию (фосфорилирование), аллостерическую регуляцию — гормонзависимый регуляторный каскад, который действует на ферменты фосфорилирования и дефосфорилирования. В более активной фосфорилазе *a* специфические остатки Ser на обеих субъединицах фосфорилированы. Она превращается в менее активную фосфорилазу *b* при удалении фосфорильных групп, осуществляемом фосфатазой фосфорилазы 1 (PP1). Обратная реакция происходит под действием киназы фосфорилазы. Активность обеих форм фермента подвержена аллостерической регуляции активатором (AMP) и ингибиторами (глюкозо-6-фосфат и ATP), которые связываются с разными центрами на молекуле фермента. Активности киназы фосфорилазы и PP1 также регулируются коротким каскадом, зависимым от гормонов глюкагона и адреналина. При низком содержании сахара в крови поджелудочная железа и надпочечники начинают вырабатывать глюкагон и адреналин. Адреналин связывается со своим рецептором в мышцах и некоторых других тканях и активирует аденилатциклазу. Глюкагон играет похожую роль, связываясь с рецептором в печени и вызывая синтез большого количества модифицированного нуклеотида — циклического AMP (сAMP; см. с. 427), активирующего фермент сAMP-зависимую протеинкиназу (PKA). PKA фосфорилирует некоторые белки-мишени, среди которых киназа фосфорилазы и ингибитор фосфопротеинфосфатазы 1 (PPI-1). Фосфорилированная киназа фосфорилазы активируется, и в свою очередь, фосфорилирует и активирует гликогенфосфорилазу. В то же время фосфорилированная PPI-1 взаимодействует с PP1 и ингибирует ее действие. Кроме того, PPI-1 поддерживает себя в активной (фосфорилированной) форме путем ингибирования фосфопротеинфосфатазы 2B (PP2B), которая дефосфорилирует и тем самым инактивирует PPI-1. При этом равновесие между *a* и *b* формами гликогенфосфорилазы сильно сдвинуто в сторону более активной гликогенфосфорилазы *a*. Обе формы киназы фосфорилазы до некоторой степени активируются ионами Ca^{2+} (не показано). Подробнее см. в гл. 14, 15 и 23.

Таблица 6-10 Консенсусные последовательности в протеинкиназах

Протеинкиназа	Консенсусная последовательность и фосфорилированный остаток*
Протеинкиназа А	-x-R-[RK]-x-[ST]-B-
Протеинкиназа G	-x-R-[RK]-x-[ST]-x-
Протеинкиназа C	-[RK](2)-x-[ST]-B-[RK](2)-
Протеинкиназа B	-x-R-x-[ST]-x-K-
Ca ²⁺ /кальмодулин-киназа I	-B-x-R-x(2)-[ST]-x(3)-B-
Ca ²⁺ /кальмодулин-киназа II	-B-x-[RK]-x(2)-[ST]-x(2)
Киназа легкой цепи миозина (гладких мышц)	-K(2)-R-x(2)-S-x-B(2)-
Киназа фосфоорилазы <i>b</i>	-K-R-K-Q-I-S-V-R-
Регулируемая внеклеточным сигналом киназа ERK	-P-x-[ST]-P(2)-
Циклин-зависимая протеинкиназа (<i>cdc2</i>)	-x-[ST]-P-x-[KR]-
Казеинкиназа I	-[SpTr]-x(2)-[ST]-B-**
Казеинкиназа II	-x-[ST]-x(2)-[ED]-x-
Киназа β-адренергического рецептора	-[DE](n)-[ST]-x(3)-
Родопсинкиназа	-x(2)-[ST]-(E)(n)-
Киназа инсулинового рецептора	-x-E(3)-Y-M(4)-K(2)-S-R-G-D-Y-M-T-M-Q-I-G-K(3)-L-P-A-T-G-D-Y-M-N-M-S-P-V-G-D-
Киназа рецептора эпидермального фактора роста (EGF)	-E(A)-Y-F-E-L-V-

Источник: Pinna, L.A. & Ruzzene, M.H. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191–225; Kemp, B.E. & Pearson, R.B. (1990) Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 342–346; Kennelly, P.J. & Krebs, E.G. (1991) Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15555–15558.

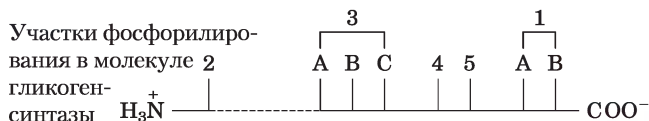
*Латинскими буквами обозначены остатки, выведенные из нуклеотидной последовательности, а курсивом — реальные аминокислотные остатки в последовательностях известных субстратов. Остатки Ser (S), Thr (T) и Tyr (Y), подвергающиеся фосфорилированию, выделены красным цветом (однобуквенную номенклатуру аминокислот см. в табл. 3-1). x означает любую аминокислоту, B — любую гидрофобную аминокислоту, Sp, Tr и Yr — уже фосфорилированные остатки Ser, Thr и Tyr соответственно.

** Наилучшая мишень содержит два аминокислотных остатка, разделяющие фосфорилированный остаток и ключевой остаток Ser/Thr. Участки с одним или тремя инвертированными остатками узнаются хуже.

некоторых протеинкиназ, является близость других фосфорилированных остатков.

Регуляция фосфорилированием часто довольно сложна. Некоторые белки имеют консенсусные последовательности, узнаваемые несколькими разными протеинкиназами, каждая из которых может фосфорилировать белок и менять его ферментативную активность. В других случаях фосфорилирование протекает, как иерархический процесс: определенный остаток может фосфорилироваться только в том случае, если соседний остаток уже фосфорилирован. Например, гликогенсинтаза, катализирующая

конденсацию мономерных глюкозных звеньев с образованием гликогена (гл. 15), инактивируется при фосфорилировании специфических остатков Ser, причем ее активность может модулироваться также действием по крайней мере четырех других протеинкиназ, фосфорилирующих четыре других участка фермента (рис. 6-37). Гликогенсинтаза не может быть субстратом для киназы гликогенсинтазы 3, пока один участок не будет фосфорилирован казеинкиназой II. Присоединение фосфатных групп в разных участках в разной степени ингибирует гликогенсинтазу, причем в некоторых случаях фосфорилирование



Киназа	Участок фосфорилирования	Степень инактивации фермента
Протеинкиназа А	1А, 1В, 2, 4	+
Протеинкиназа G	1А, 1В, 2	+
Протеинкиназа С	1А	+
Ca ²⁺ /кальмодулин-киназа	1В, 2	+
Киназа фосфорилазы b	2	+
Казеинкиназа I	По крайней мере девять	++++
Казеинкиназа II	5	0
Киназа гликогенсинтазы 3	3А, 3В, 3С	+++
Киназа гликогенсинтазы 4	2	+

оказывает кумулятивное действие. Подобное множественное фосфорилирование позволяет очень тонко регулировать активность фермента.

Для эффективности данного механизма регулирования фосфорилирование должно быть обратимым. Обычно фосфатные группы присоединяются и удаляются разными ферментами, следовательно, эти процессы могут регулироваться раздельно. В клетках содержится семейство фосфопроteinфосфатаз, гидролизующих эфирные связи (P)–Ser, (P)–Thr и (P)–Tyr с высвобождением неорганического фосфата. Известные на настоящий момент фосфопроteinфосфатазы действуют не на все фосфопроteины, однако они обладают меньшей субстратной специфичностью, чем протеинкиназы.

Некоторые ферменты и другие белки регулируются путем протеолитического расщепления предшественника

Некоторые ферменты переходят в активную форму после расщепления неактивного предшественника, называемого **зимогеном**. В частности, таким образом регулируются многие протеолитические ферменты (протеазы) же-

Рис. 6-37. Множественное фосфорилирование. Фермент гликогенсинтаза имеет по меньшей мере девять отдельных участков фосфорилирования клеточными протеинкиназами в пяти обозначенных на схеме областях молекулы. Таким образом, регуляция данного фермента происходит не по принципу включения/выключения активности, а путем гораздо более тонкой модуляции в ответ на различные сигналы.

лудка и поджелудочной железы. Химотрипсин и трипсин исходно синтезируются в виде химотрипсиногена и трипсиногена (**рис. 6-38**). Специфическое расщепление вызывает конформационные изменения, в результате которых активный центр этих ферментов становится доступен. Поскольку такая активация необратима, для инактивации этих ферментов должны существовать другие механизмы. Инактивация протеаз происходит под действием белков-ингибиторов, которые очень прочно связываются в активном центре. Например, панкреатический ингибитор трипсина ($M_r = 6000$) связывается с трипсином и ингибирует его; α_1 -антипротеиназа ($M_r = 53\,000$) в первую очередь ингибирует эластазу нейтрофилов (нейтрофилы — один из видов лейкоцитов, белых клеток крови; эластаза расщепляет эластин, входящий в состав некоторых соединительных тканей). Недостаточность α_1 -антипротеиназы, которая встречается у курильщиков, может приводить к повреждениям легких, в том числе эмфиземе.

Протеазы — не единственные белки, активирующиеся путем протеолиза. Однако в других случаях белки-предшественники называют не зимогенами, а **проферментами**, или **пробелками**. Например, коллаген, входящий в состав соедини-

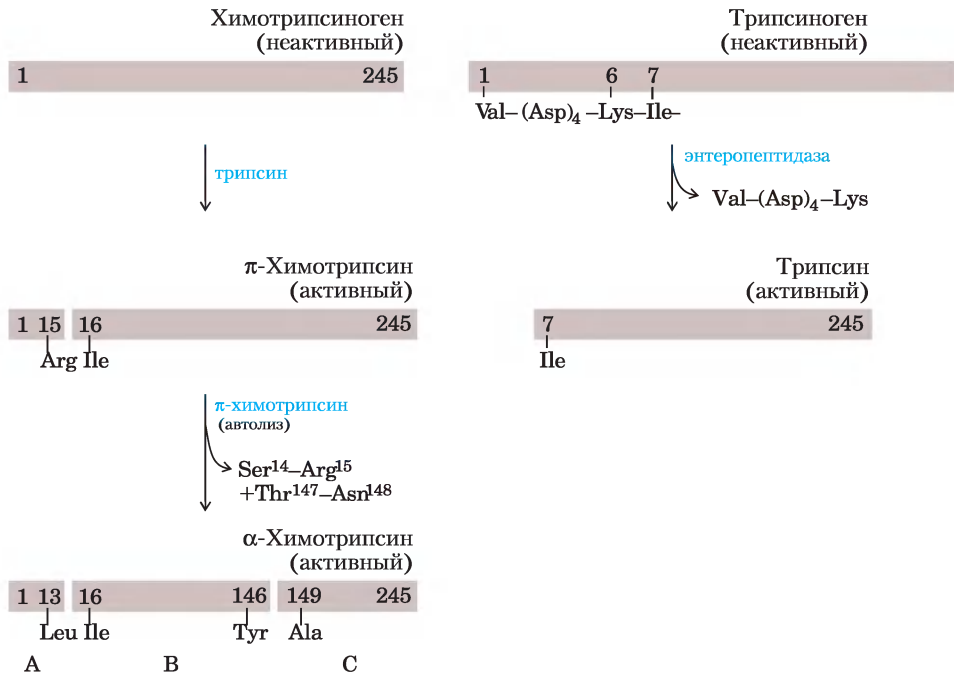


Рис. 6-38. Активация зимогенов путем протеолитического расщепления. Представлен механизм образования химотрипсина и трипсина из зимогенов. Полосами изображены последовательности аминокислот в полипептидных цепях, номера означают относительное местонахождение аминокислотных остатков (N-концевой остаток имеет номер 1). Под полоской указаны остатки на концах полипептидного фрагмента после расщепления. Обратите внимание, что в окончательной активной форме некоторые остатки отсутствуют. Три полипептидные цепи химотрипсина (А, В и С) связаны дисульфидными мостиками.

тельных тканей, исходно синтезируется как растворимый предшественник — проколлаген. Система свертывания крови предлагает множество примеров протеолитической активации. Белок кровяных сгустков фибрин образуется в результате протеолиза неактивного пробелка фибриногена. За это превращение отвечает протеаза тромбин (во многих отношениях напоминающая химотрипсин), а сама она возникает в результате протеолиза протромбина (в данном случае зимогена).

Некоторые регуляторные ферменты используют несколько механизмов регуляции

Гликогенфосфорилаза катализирует первую реакцию метаболического пути, в результате которой запасная глюкоза конвертируется в необходимую клетке энергию (гл. 14 и 15). Это важный метаболический путь, и его регуляция происходит довольно сложным образом. Хотя

активность гликогенфосфорилазы в первую очередь регулируется посредством ковалентной модификации, как показано на рис. 6-36, кроме того, она подвержена аллостерической регуляции под действием АМР — активатора фосфорилазы *b*, а также глюкозо-6-фосфата и АТР (оба ингибиторы). Кроме того, ферменты, которые добавляют и удаляют фосфорильные группы, в свою очередь подвержены регуляции гормонами, контролирующими уровень сахара в крови (рис. 6-36; см. также гл. 15 и 23).

Другие сложные регуляторные ферменты обнаружены в точках пересечения метаболических путей. Бактериальная глутаминсинтетаза, катализирующая реакцию, с помощью которой восстановленный азот включается в метаболизм клетки (гл. 22), относится к наиболее сложным из известных ферментов. Она подчиняется аллостерической регуляции по механизму обратимой ковалентной модификации (с участием не менее

восьми модуляторов); кроме того, действие фермента регулируется связыванием с другими регуляторными белками (на этом механизме мы остановимся подробно при обсуждении регуляции отдельных метаболических путей).

В чем преимущество столь сложной регуляции ферментативной активности? Начиная данную главу, мы подчеркивали центральную роль катализа для самого существования жизни. *Контроль* этого катализа также жизненно важен. Если бы все возможные реакции в клетке протекали одновременно, то макромолекулы и метаболиты быстро бы распались на гораздо более простые химические соединения. Но этого не происходит, поскольку клетки катализируют только те реакции, в которых нуждаются в текущий момент. При обилии химических ресурсов клетки синтезируют и накапливают глюкозу и другие метаболиты. При истощении ресурсов клетки начинают использовать свои запасы в качестве топлива, необходимого для метаболизма. Химическая энергия расходуется экономно, распределяясь по различным метаболическим путям в соответствии с текущими нуждами. Наличие мощных катализаторов, специфичных для каждой отдельной реакции, позволяет осуществлять эту регуляцию. Все это вместе создает сложный, тонко регулируемый комплекс, который мы называем жизнью.

Краткое содержание раздела 6.5 РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

- Активность метаболических путей в клетке регулируется путем контроля активности определенных ферментов.
- При ингибировании по принципу обратной связи конечный продукт метаболического пути ингибирует первый фермент, действующий на данном пути.
- Активность аллостерических ферментов контролируется путем обратимого связывания специфических модуляторов в регуляторном центре. Модулятором может выступать сам субстрат или какой-либо другой метаболит; действие модулятора может быть ингибирующим или активирующим. Кинетическое

поведение аллостерических ферментов отражает кооперативный характер взаимодействия между субъединицами.

- Действие других регуляторных ферментов регулируется путем ковалентной модификации специфических функциональных групп, необходимых для катализа. Одним из самых распространенных способов регуляции ферментативной активности является фосфорилирование аминокислотных остатков.
- Многие протеолитические ферменты исходно синтезируются как неактивные предшественники (зимогены), активируемые отщеплением небольшого пептидного фрагмента.
- Ферменты, действующие на пересечениях важных метаболических путей, могут регулироваться путем сложной комбинации воздействий, что позволяет координировать активность этих метаболических путей.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

Активный центр 273	Константа диссоциации (K_d) 290
Аллостерический модулятор 319	Константа Михаэлиса (K_M) 288
Аллостерический фермент 319	Константа равновесия (K_{eq}) 276
Аналоги переходного состояния 307	Константа скорости 276
Апофермент 272	Константа скорости (k_{cat}) 276
Бесконкурентное ингибирование 297	Кофактор 271
Зимоген 328	Кофермент 271
Ингибирование по принципу обратной связи 321	Лимитирующая стадия 275
Индуцированное соответствие 282	Максимальная скорость (V_{max}) 286
Интермедиат (промежуточное соединение) 275	Начальная скорость (v_0) 286
Ковалентный катализ 284	Неконкурентное ингибирование 297
Конкурентное ингибирование 295	Необратимое ингибирование 298
	Обратимое ингибирование 295

Общий кислотно-основной катализ 283	Стационарное состояние 287
Основное состояние 274	Стационарная кинетика 287
Переходное состояние 274	Субстрат 273
Предстационарное состояние 287	Суицидный ингибитор 298
Протестическая группа 271	Уравнение Лайнуивера–Берка 289
Протеинкиназа 324	Уравнение Михаэлиса–Ментен 288
Регуляторный фермент 319	Фермент 270
Смешанное ингибирование 297	Ферментативная кинетика 285
Специфичность 281	Холофермент 271
Специфический кислотно-основной катализ 284	Число оборотов 291
Стандартное изменение свободной энергии (ΔG°) 274	Энергия активации (ΔG^\ddagger) 274
	Энергия связывания (ΔG_B) 277

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая информация

Evolution of Catalytic Function. (1987) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52

Прекрасный сборник фундаментальных статей; продолжает быть актуальным.

Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, W.H. Freeman and Company, New York.

Понятно написанное и углубленное введение в ферментативный катализ.

Frey, P.A. & Hegeman, A.D. (2006) *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, New York.

Современное описание реакций, идущих в живых организмах.

Friedmann, H. (ed.) (1981) *Benchmark Papers in Biochemistry*, Vol. 1: *Enzymes*, Hutchinson Ross Publishing Company, Stroudsburg, PA.

Сборник классических статей по ферментативной кинетике с историческими комментариями от издателя. Очень интересно.

Jencks, W.P. (1987) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, Dover Publications, Inc., New York.

Выдающаяся книга по данной тематике.

Kornberg, A. (1989) *For the Love of Enzymes: The Odyssey of a Biochemist*, Harvard University Press, Cambridge.

Принципы катализа

Amyes, T.L., O'Donoghue, A.C., & Richard, J.P. (2001) Contribution of phosphate intrinsic binding energy to the en-

zymatic rate acceleration for triosephosphate isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 11325–11326.

Gutteridge, A. & Thornton, J.M. (2005) Understanding nature's catalytic toolkit. *Trends Biochem. Sci.* 30, 622–629.

Увлекательное обсуждение того, откуда берется энергия связи и как она используется.

Hammes-Schiffer, S. & Benkovic, S.J. (2006) Relating protein motion to catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 519–541.

Хорошее описание важной роли движения белков в катализе.

Hensen, D.E. & Raines, R.T. (1990) Binding energy and enzymatic catalysis. *J. Chem. Educ.* 67, 483–489.

Изложение принципов ферментативного катализа для начинающих студентов.

Harris, T.K. & Turner, G.J. (2002) Structural basis of perturbed pK_a values of catalytic groups in enzyme active sites. *IUBMB Life* 53, 85–98.

Kraut, D.A., Carroll, K.S., & Herschlag, D. (2003) Challenges in enzyme mechanism and energetics. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 517–571.

Хороший обзор принципов ферментативного катализа, как уже понятых, так и тех, что еще предстоит понять.

Kraut, J. (1988) How do enzymes work? *Science* 242, 533–540.

Lerner, R.A., Benkovic, S.J., & Schulz, P.G. (1991) At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science* 252, 659–667.

Miller, B.G. & Wolfenden, R. (2002) Catalytic proficiency: the unusual case of OMP decarboxylase. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 847–885.

Оротидинмонофосфатдекарбоксилаза — чемпион среди ферментов по увеличению скорости реакции.

Schramm, V.L. (1998) Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 693–720.

Много хороших иллюстраций тех принципов, что были изложены в данной главе.

Кинетика

Cleland, W.W. (1977) Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol.* 45, 237–387.

Cleland, W.W. (2002) Enzyme kinetics: steady state. In *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Vol. 6, pp. 421–425, Nature Publishing Group, London.

Эта статья была опубликована первый раз в 1998 г. С 2001 г. энциклопедия доступна в Интернете по подписке на сайте www.els.net. Ясное и продуманное изложение основ предмета.

Raines, R.T. & Hansen, D.E. (1988) An intuitive approach to steady-state kinetics. *J. Chem. Educ.* 65, 757–759.

Примеры действия ферментов

Babbitt, P.C. & Gerlt, J.A. (1997) Understanding enzyme superfamilies: chemistry as the fundamental determinant in the evolution of new catalytic activities. *J. Biol. Chem.* **27**, 30591–30594.

Интересное описание эволюции ферментов с различной каталитической специфичностью при использовании ограниченного репертуара структурных мотивов.

Babbitt, P.C., Hasson, M.S., Wedekind, J.E., Palmer, D.R.J., Barrett, W.C., Reed, G.H., Rayment, I., Ringe, D., Kenyon, G.L. & Gerlt, J.A. (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the β protons of carboxylic acids. *Biochemistry* **35**, 16489–16501.

Интересное обсуждение каталитической активности ферментов и лежащих в ее основе принципов.

Kirby, A.J. (2001) The lysozyme mechanism sorted — after 50 years. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 737–739.

Warshel, A., Naray-Szabo, G., Sussman, F., & Hwang, J.-K. (1989) How do serine proteases really work? *Biochemistry* **28**, 3629–3637.

Регуляторные ферменты

Barford, D., Das, A.K., & Egloff, M.-P. (1998) The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 133–164.

Ehrmann, M. & Clausen, T. (2004) Proteolysis as a regulatory mechanism. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 709–724.

Hunter, T. & Plowman, G.D. (1997) The protein kinase of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 18–22.

Детали действия разных представителей этого важного класса ферментов в модельной эукариотической клетке.

Johnson, L.N. & Barford, D. (1993) The effect of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 1999–232.

Koshland, D.E., Jr. & Neet, K.E. (1968) The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **37**, 359–410.

Monod, J., Changeux, J.-P., & Jacob, F. (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* **6**, 306–329.

Классическая статья, в которой вводится концепция аллостерической регуляции.

Вопросы и задачи

1. Сохранение сладкого вкуса кукурузы. Сладкий вкус зерен в свежесобранных початках кукурузы обусловлен высоким содержанием в них сахара. Через несколько дней после сбора кукуруза уже не такая сладкая, поскольку за один день хранения около 50% свободного сахара в зернах

превращается в крахмал. Чтобы лучше сохранить сладкий вкус свежесобранной кукурузы, очищенные початки на несколько минут помещают в кипящую воду («бланшируют»), а затем охлаждают в холодной воде. Кукуруза, обработанная таким образом и хранящаяся в замороженном виде, сохраняет свой сладкий вкус. В чем биологический смысл подобной процедуры?

2. Внутриклеточная концентрация ферментов. Чтобы оценить концентрацию ферментов в бактериальной клетке, предположим, что в цитозоле содержатся равные концентрации 1000 разных ферментов и что молекулярная масса каждого белка составляет 100 000. Кроме того, предположим, что бактериальная клетка имеет форму цилиндра диаметром 1 мкм и высотой 2 мкм, цитозоль (плотность 1,20) содержит 20% по массе растворимого белка и весь этот белок состоит из ферментов. Рассчитайте среднюю молярную концентрацию каждого фермента в данной гипотетической клетке.

3. Ускорение реакции под действием уреазы. Фермент уреазы при pH 8,0 и 20 °C ускоряет гидролиз мочевины в 10^{14} раз. Если заданное количество мочевины может полностью прогидролизовать заданное количество уреазы при pH 8,0 и 20 °C за 5 мин, сколько времени потребовалось бы для гидролиза того же количества мочевины в тех же условиях, но без фермента? Предполагается, что обе реакции происходят в стерильных условиях без доступа бактерий.

4. Защита фермента от тепловой денатурации. При нагревании раствора фермента происходит постепенная потеря его каталитической активности, что связано с денатурацией фермента. При инкубации раствора гексокиназы в течение 12 мин при 45 °C фермент теряет 50% активности, но если инкубацию проводить в присутствии очень высокой концентрации одного из субстратов, то потеря активности за 12 мин составит лишь 3%. Объясните, почему тепловая денатурация гексокиназы замедляется в присутствии субстрата.

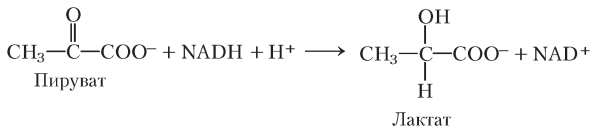
5. Требования к активным центрам ферментов. Карбоксипептидаза, последовательно отщепляющая C-концевые аминокислотные остатки своих

пептидных субстратов, представляет собой полипептид, состоящий из 307 остатков. Две основные каталитические группы в активном центре фермента — это Arg¹⁴⁵ и Glu²⁷⁰.

а) Если бы цепь карбоксипептидазы была свернута в идеальную α -спираль, на каком расстоянии друг от друга (в Å) находились бы остатки Arg¹⁴⁵ и Glu²⁷⁰. *Подсказка.* См. рис. 4-4, а.

б) Объясните, каким образом эти две аминокислоты могут катализировать реакцию, находясь на расстоянии в несколько ангстремов.

6. Количественное определение лактатдегидрогеназы. Фермент мышц лактатдегидрогеназа катализирует реакцию NADH и NAD⁺ — восстановленная и окисленная



формы кофермента NAD. Раствор NADH, но не NAD⁺, поглощает свет с длиной волны 340 нм. Это свойство используется для определения концентрации NADH в растворе с помощью спектрофотометрического измерения поглощения света при 340 нм. Объясните, каким образом можно использовать NADH при количественном определении лактатдегидрогеназы.

7. Роль фермента в химической реакции. Какие из перечисленных ниже изменений в ходе химической реакции могут быть вызваны присутствием катализатора?

а) Уменьшение K'_{eq} ; б) увеличение k_1 ; в) увеличение K'_{eq} ; г) увеличение ΔG^\ddagger ; д) уменьшение ΔG^\ddagger ;

$$\text{S} \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} \text{P} \quad \text{где} \quad K'_{\text{eq}} = \frac{[\text{P}]}{[\text{S}]}$$

е) более отрицательное значение ΔG° ; ж) увеличение k_2 .

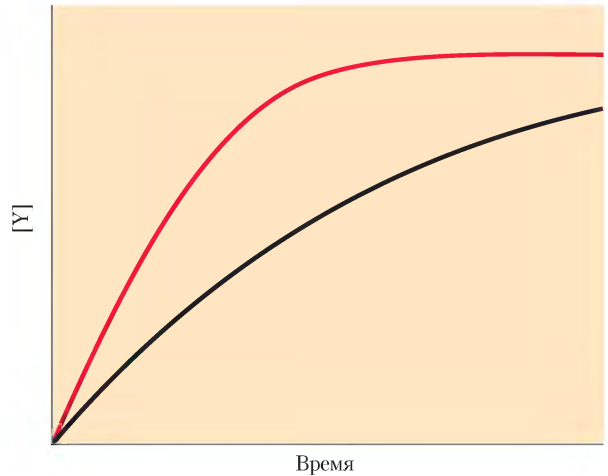
8. Связь между скоростью реакции и концентрацией субстрата: уравнение Михаэлиса–Ментен.

а) При какой концентрации субстрата фермент с $k_{\text{cat}} = 30 \text{ с}^{-1}$ и $K_M = 0,005 \text{ М}$ будет катализировать реакцию со скоростью, равной $1/4 V_{\text{max}}$?

б) Определите, какая доля V_{max} будет достиг-

нута при концентрациях субстрата $[\text{S}] = 1/2 K_M$, $2 K_M$ и $10 K_M$.

в) Из двух видов бактерий выделили по одному ферменту, катализирующему реакцию $\text{X} \rightleftharpoons \text{Y}$. Ферменты имеют одинаковые значения V_{max} , но разные значения K_M по субстрату X. Константа Михаэлиса для фермента А составляет 2,0 мкМ, а для фермента В 0,5 мкМ. Представленный ниже график иллюстрирует ход реакции под действием ферментов, взятых в одинаковых концентрациях, при $[\text{X}] = 1 \text{ мкМ}$. Какая кривая какому ферменту соответствует?



9. Применение уравнения Михаэлиса–Ментен (I). В лаборатории открыта новая версия фермента веселазы, которую назвали веселазой*; фермент катализирует следующую реакцию:



Начато изучение свойств фермента.

а) В первом эксперименте при $[\text{E}_t] = 4 \text{ нМ}$ нашли $V_{\text{max}} = 1,6 \text{ мкМ} \cdot \text{с}^{-1}$. Зная это, определите константу k_{cat} (в соответствующих единицах) для веселазы*.

б) Во втором эксперименте при $[\text{E}_t] = 1 \text{ нМ}$ и $[\text{ВЕСЕЛЬЕ}] = 30 \text{ мкМ}$ нашли $v_0 = 300 \text{ нМ} \cdot \text{с}^{-1}$. Расчитайте экспериментальное значение K_M (в соответствующих единицах) для веселазы* с субстратом ВЕСЕЛЬЕ?

в) Дальнейшие исследования показали, что веселаз*, которую использовали в двух первых экспериментах, хотя и была предварительно подвергнута очистке, на самом деле содержала примесь обратимого ингибитора, называемого ЗЛОСТЬ. Примесь ЗЛОСТИ была тщательно удалена из образца фермента, и два эксперимента провели вновь: в условиях эксперимента (а) $V_{\max} = 4,8 \text{ мкМ} \cdot \text{с}^{-1}$, в условиях эксперимента (б) $K_M = 15 \text{ мкМ}$. Рассчитайте параметры α и α' для ингибитора ЗЛОСТЬ.

г) Исходя из представленной выше информации определите, к какому типу ингибиторов относится ЗЛОСТЬ.

10. Применение уравнения Михаэлиса–Ментен (II). Найден фермент, катализирующий реакцию



Для этого фермента и субстрата А константа Михаэлиса $K_M = 4 \text{ мкМ}$, а $k_{\text{cat}} = 20 \text{ мин}^{-1}$.

а) В одном эксперименте при концентрации $[A] = 6 \text{ мМ}$ начальная скорость реакции $v_0 = 480 \text{ нМ} \cdot \text{мин}^{-1}$. Какой была концентрация фермента $[E_c]$ в этом эксперименте?

б) В следующем эксперименте при концентрации $[E_c] = 0,5 \text{ М}$ начальная скорость $v_0 = 5 \text{ мкМ} \cdot \text{мин}^{-1}$. Какой была концентрация субстрата $[A]$ в этом эксперименте?

в) Обнаружено, что вещество Z является очень сильным конкурентным ингибитором данного фермента с $\alpha = 10$. В эксперименте с той же концентрацией фермента $[E_c]$, как в задании (а), но при другой концентрации $[A]$ был добавлен ингибитор Z, что привело к снижению скорости v_0 до $240 \text{ нМ} \cdot \text{мин}^{-1}$. Какова концентрация $[A]$ в этом эксперименте?

г) Основываясь на кинетических параметрах, приведенных выше, скажите, достигает ли этот фермент «каталитического совершенства»? Кратко объясните свой ответ, используя кинетический(е) параметр(ы), чтобы определить «каталитическое совершенство».

11. Оценка V_{\max} и K_M по экспериментальным данным. Хотя существуют методы точного определения V_{\max} и K_M (доп. 6-1), иногда эти параметры можно быстро оценить по значениям начальных скоростей v_0 при разных концентрациях субстрата. Оцените V_{\max} и K_M фермента-

тивной реакции на основании приведенных в таблице данных.

[S] (М)	v_0 (мкМ/мин)
$2,5 \cdot 10^{-6}$	28
$4,0 \cdot 10^{-6}$	40
$1 \cdot 10^{-5}$	70
$2 \cdot 10^{-5}$	95
$4 \cdot 10^{-5}$	112
$1 \cdot 10^{-4}$	128
$2 \cdot 10^{-3}$	139
$1 \cdot 10^{-2}$	140

12. Свойства фермента, участвующего в синтезе простагландинов. Простагландины (ПГ) составляют отдельный класс эйкозаноидов; эти производные жирных кислот оказывают очень сильное влияние на ткани позвоночных животных. Простагландины связаны с возникновением лихорадки и воспаления, а также с сопутствующими им болевыми ощущениями. Простагландины образуются из 20-углеродной жирной кислоты, называемой арахидоновой кислотой, в реакции, которую катализирует фермент простагландин-эндопероксид-синтаза. Этот фермент из класса циклооксигеназ использует кислород для превращения арахидоновой кислоты в ПГ G_2 , являющийся непосредственным предшественником многих простагландинов (синтез простагландинов обсуждается в гл. 21).

а) Ниже представлены кинетические данные для реакции, катализируемой простагландин-эндопероксид-синтазой. Обращая внимание на первые две колонки, определите V_{\max} и K_M для данного фермента.

Концентрация арахидоновой кислоты (мМ)	Скорость образования ПГ G_2 (мМ/мин)	Скорость образования ПГ G_2 в присутствии
		10 мг/мл ибупрофена (мМ/мин)
0,5	23,5	16,67
1,0	32,2	25,25
1,5	36,9	30,49
2,5	41,8	37,04
3,5	44,0	38,91

б) Ибупрофен является ингибитором простагландин-эндопероксид-синтазы. Путем ингибирования синтеза ПГ ибупрофен снижает воспаление и боль. Используя данные первой и третьей колонок, определите тип ингибирования ибупрофеном реакции, катализируемой простагландин-эндопероксид-синтазой.

13. Графический анализ V_{\max} и K_M . Представленные ниже экспериментальные данные получены при изучении ферментативной активности кишечной пептидазы с глицилглицином в качестве субстрата.



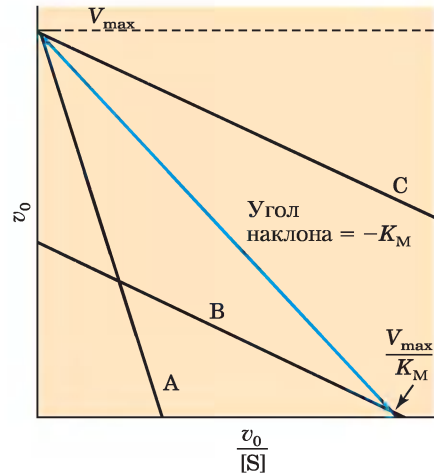
[S] (M)	Образование продукта (мкМ/мин)
1,5	0,21
2,0	0,24
3,0	0,28
4,0	0,33
8,0	0,40
16,0	0,45

По графику (доп. 6-1) определите V_{\max} и K_M для данных фермента и субстрата.

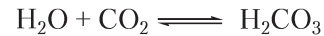
14. Уравнение Иди–Хофсти. Одним из возможных преобразований уравнения Михаэлиса–Ментен является уравнение Лайнуивера–Берка. Умножая обе части уравнения Лайнуивера–Берка на V_{\max} и осуществляя перестановку, получаем уравнение Иди–Хофсти:

$$v_0 = (-K_M) \frac{v_0}{[S]} + V_{\max}$$

Ниже представлена зависимость v_0 от $v_0/[S]$ для ферментативной реакции. Синяя кривая была получена без ингибитора. Какая кривая (А, В или С) получена в присутствии конкурентного ингибитора? *Подсказка.* См. уравнение 6-30.



15. Число оборотов карбоангидразы. Карбоангидраза эритроцитов ($M_r = 30\,000$) — один из наиболее активных ферментов. Она катализирует обратимую гидратацию CO_2 .



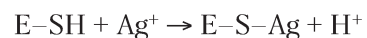
Данная реакция играет важную роль в транспорте CO_2 от тканей к легким. Каково число оборотов карбоангидразы (в единицах/мин), если при 37°C 10 мкг чистого фермента катализируют гидратацию 0,3 г CO_2 в мин?

16. Уравнение скорости реакции при конкурентном ингибировании. Запишем уравнение скорости реакции при конкурентном ингибировании:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_M + [S]}$$

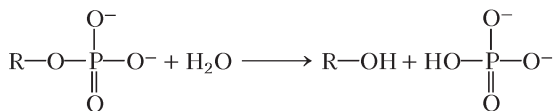
Выведите это уравнение, если общая концентрация фермента $[E]_{\text{общ}} = [E] + [EI] + [ES]$. Определения α и K_I даны в тексте. Действуйте по аналогии с выводом уравнения Михаэлиса–Ментен.

17. Необратимое ингибирование фермента. Многие ферменты подвергаются необратимому ингибированию ионами тяжелых металлов, такими как Hg^{2+} , Cu^{2+} или Ag^+ , вступающими в реакцию с важными сульфгидрильными группами с образованием меркаптидов:



Сродство ионов Ag^+ к сульфгидрильной группе настолько велико, что эти ионы можно использовать для количественного титрования SH-групп. К 10 мл раствора, содержащего 1 мг/мл чистого фермента, добавили ровно столько AgNO_3 , сколько нужно для полной инактивации фермента. Для этого понадобилось 0,432 мкмоль AgNO_3 . Рассчитайте минимальную молекулярную массу фермента. Почему рассчитанная по этим данным молекулярная масса соответствует ее *минимальному* значению?

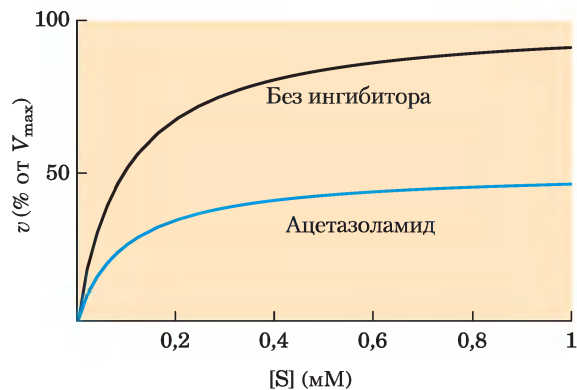
18. Клиническое применение избирательного ингибирования ферментов. В сыворотке крови человека содержатся ферменты, называемые кислыми фосфатазами, которые гидролизуют эфиры фосфорной кислоты в слабокислой среде (pH 5,0):



Кислые фосфатазы синтезируются в эритроцитах, печени, селезенке и предстательной железе. Фермент из предстательной железы имеет важное клиническое значение, поскольку повышение его активности в крови может быть признаком возникновения рака простаты. Фосфатаза из предстательной железы сильно ингибируется тартрат-ионами, тогда как кислые фосфатазы из других тканей таким путем не ингибируются. Как можно использовать эти данные для разработки специфического метода определения активности кислой фосфатазы из предстательной железы в сыворотке крови человека?

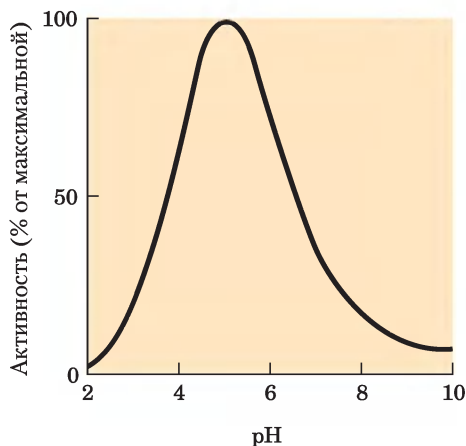
19. Ингибирование карбоангидразы ацетазоламидом. Карбоангидраза сильно ингибируется лекарственным препаратом ацетазоламидом, которое применяют в качестве мочегонного средства и при глаукоме для снижения глазного давления (повышение которого связано с избыточным накоплением внутриглазной жидкости). Карбоангидраза играет важную роль в этих и других секреторных процессах, поскольку она участвует в регуляции уровня pH и содержания бикарбоната во многих жидкостях организма. Верхняя кривая на рисунке отражает зависимость начальной скорости реакции (в процентах от V_{max}), катализируемой карбоангидразой, от концентрации субстрата.

Нижняя кривая была построена при проведении эксперимента в присутствии ацетазоламида. Проанализируйте ход кривых на основе кинетических свойств конкурентных и смешанных ингибиторов и определите природу ингибирования ацетазол-амидом. Поясните свои рассуждения.



20. Действие обратимых ингибиторов. Выведите уравнение, описывающее влияние обратимого ингибитора на кажущуюся константу $K_{\text{M, каж}} = \alpha K_{\text{M}}/\alpha'$. Исходите из уравнения 6-30 и того факта, что $K_{\text{M, каж}}$ равна концентрации субстрата, при которой $v_0 = V_{\text{max}}/2\alpha'$.

21. Оптимальный pH для действия лизоцима. В активном центре лизоцима расположены два аминокислотных остатка Glu^{35} и Asp^{52} , играющих основную роль в катализе. Значения $\text{p}K_{\text{a}}$ карбоксильных групп боковых цепей этих остатков равны 5,9 и 4,5 соответственно. В каком состоянии ионизации (протонированном или депротонированном) находятся эти ами-



нокислотные остатки при оптимальном для лизоцима рН 5,2? Объясните зависимость активности лизоцима от рН, которая приведена на рисунке, если учитывать ионизацию этих остатков?

22. Учимся решать кинетические задачи (обратитесь к графикам в гл. 6).

а) Используя график для уравнения 6-9, изобразите зависимость скорости реакции от $[S]$. Используйте значения $V_{\max} = 100 \text{ мкМ} \cdot \text{с}^{-1}$ и $K_M = 10 \text{ мкМ}$. Как сильно возрастает v_0 при удвоении $[S]$ от 0,2 до 0,4 мкМ? Чему равно v_0 при $[S] = 10 \text{ мкМ}$? Как увеличится v_0 при увеличении $[S]$ от 100 до 200 мкМ? Обратите внимание на изменение вида графика при двукратном увеличении или уменьшении V_{\max} или K_M .

б) Используя график для уравнения 6-9 и кинетические параметры из задания (а), постройте зависимость для случая $\alpha = \alpha' = 1$. Посмотрите, что произойдет с графиком при $\alpha = 2$; $\alpha' = 3$; $\alpha = 2$ и $\alpha' = 3$.

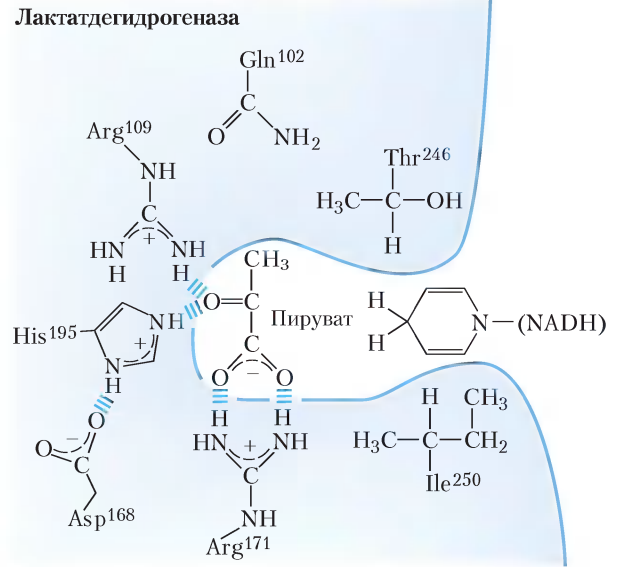
в) Используя график для уравнения 6-9 и уравнение Лайнуивера–Берка (доп. 6-1), постройте зависимость в координатах Лайнуивера–Берка для всех случаев, перечисленных в заданиях (а) и (б). Влево или вправо сместится отрезок, отсекаемый графиком на оси x , при $\alpha = 2$? Влево или вправо смещается отрезок, отсекаемый графиком на оси x , при $\alpha = 2$ и $\alpha' = 3$?

Анализ экспериментальных данных

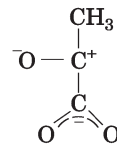
23. Изучение и изменение свойств лактатдегидрогеназы. На основе исследований строения молекул белков предложена гипотеза о связи аминокислотного состава ферментов и их функции. Один из путей проверки этой гипотезы состоит в использовании технологии рекомбинантных ДНК для создания мутантных версий фермента и изучении структуры и функций измененных форм. Метод рекомбинантных ДНК обсуждается в гл. 9.

Одним из примеров такого рода исследований может служить работа Кларка с сотрудниками по изучению фермента лактатдегидрогеназы, опубликованная в 1989 г. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует восстановление пирувата до

лактата при участии NADH (см. разд. 14.3). На рисунке схематично изображен активный центр фермента с молекулой пирувата в нем:



Механизм реакции аналогичен механизмам многих реакций, протекающих с участием NADH (рис. 13-24); происходит реакция, практически обратная той, что изображена на стадиях 2 и 3 на рис. 14-7. В переходном состоянии карбонильная группа молекулы пирувата сильно поляризована:



а) Мутантная форма ЛДГ, в которой остаток Arg¹⁰⁹ заменен на Gln, обладает лишь 5% связывающей способности фермента дикого типа к пирувату и 0,07% его активности. Как бы вы объяснили это наблюдение?

б) Мутантная форма ЛДГ, в которой остаток Arg¹⁷¹ заменен на Lys, обладает 0,05% способности фермента дикого типа связывать субстрат. Почему это изменение оказалось неожиданным?

в) В кристаллической структуре ЛДГ гуанидиновая группа Arg¹⁷¹ и карбоксильная группа пирувата расположены таким образом, как показано в копланарной конфигура-

ции типа «вилки». Зная это, дайте объяснение того колоссального изменения свойств фермента, которое происходит при замене Arg¹⁷¹ на Lys.

г) Мутантная форма ЛДГ, в которой остаток Ile²⁵⁰ заменен на Gln, слабее связывает NADH. Объясните этот результат.

Кларк с коллегами также предприняли попытку создать мутантную версию фермента, которая бы связывала и восстанавливала не пируват, а оксалоацетат. Они сделали единственную замену: заменили Gln¹⁰² на Arg; получившийся фермент должен восстанавливать оксалоацетат до малата, но не должен больше восстанавливать пируват до лактата. Таким образом, они превратили ЛДГ в малатдегидрогеназу.

д) Изобразите схематично структуру активного центра мутантной ЛДГ со связанным оксалоацетатом.

е) Объясните, почему мутантный фермент «предпочитает» оксалоацетат пирувату.

ж) Таким образом, замена на более крупную аминокислоту в активном центре фермента позволила связываться более крупному субстрату. Объясните, что в этом удивительного.

Литература

Clarke, A.R., Atkinson, T., & Holbrook, J.J. (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part I. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 101–105.

Clarke, A.R., Atkinson, T., & Holbrook, J.J. (1989) From analysis to synthesis: new ligand binding sites on the lactate dehydrogenase framework, Part II. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 145–148.

Я испытывал бы больше оптимизма по поводу блестящего будущего человечества, если бы люди тратили меньше времени на попытки обмануть Природу, а больше наслаждались ее красотами и уважали ее превосходство.

Е. Б. Уайт, Енотовое дерево, 1977

7

Углеводы и гликобиология

7.1. Моносахариды и дисахариды 340

7.2. Полисахариды 352

7.3. Гликоконъюгаты: протеогликаны, гликопротеины и гликолипиды 363

7.4. Углеводы как информационные молекулы: сахарный код 371

7.5. Методы анализа углеводов 379

Углеводы составляют большинство существующих на Земле биомолекул. Каждый год более 100 млрд т CO_2 и H_2O превращаются в целлюлозу и другие растительные продукты в результате фотосинтеза. Именно углеводы (сахар и крахмал) составляют основу питания почти всех живых организмов; окисление углеводов — главный путь получения энергии в большинстве нефотосинтезирующих клеток. Нерастворимые высокомолекулярные углеводы выполняют структурную и защитную функции в клеточных стенках бактерий и растений, а также в соединительных тканях животных. Другие высокомолекулярные углеводы служат смазкой в суставах и участвуют в узнавании и адгезии клеток. Сложные биополимеры углеводной природы, соединенные ковалентными связями с белками или липидами, называются **гликоконъюгатами**; они выполняют функцию сигнальных структур, определяющих внутриклеточную локализацию или метаболическую судьбу этих гибридных молекул. Данная глава знакомит читателя с основными классами

углеводов и гликоконъюгатов; здесь также приведены некоторые примеры их многочисленных структурных и функциональных ролей.

Углеводы представляют собой полигидроксиальдегиды или полигидроксикетоны, либо вещества, при гидролизе которых могут образоваться эти соединения. Для многих, хотя и не для всех, углеводов верна эмпирическая формула $(\text{C}_n\text{H}_m\text{O})_n$; некоторые содержат в своем составе также азот, фосфор или серу.

По размеру молекул углеводы делят на три основных класса: моносахариды, олигосахариды и полисахариды (слово сахарид происходит от греч. *sakcharon*, что означает сахар). **Моносахариды**, или простые сахара, представляют собой мономерные молекулы полигидроксиальдегидов или полигидроксикетонов. Наиболее распространенным в природе моносахаридом является шестиуглеродный сахар D-глюкоза, которую иногда называют декстрозой. Моносахариды, в составе которых более четырех атомов углерода, обычно существуют в форме циклических молекул.

Олигосахариды представляют собой короткие цепи, построенные из моносахаридных звеньев, или остатков, соединенных гликозидными связями. Чаще встречаются **дисахариды**, состоящие из двух моносахаридных звеньев. Типичным примером может служить сахароза (тростниковый сахар), состоящая из двух шестиуглеродных сахаров D-глюкозы и D-фруктозы. Названия всех моно- и дисахаридов оканчиваются на «оза». Большинство олигосахаридов, состоящих из трех и большего числа остатков, находятся в клетке не в свободном состоянии, а в виде

соединений с другими молекулами (белками или липидами), образуя гликоконъюгаты.

Полисахаридами (углеводами) называют полимеры сахаров, состоящие из 20 и большего числа моносахаридных звеньев; в некоторых полисахаридах сотни и даже тысячи мономерных единиц. Некоторые полисахариды, такие как целлюлоза, представляют собой линейные цепи, другие, например гликоген, имеют разветвленное строение. Как гликоген, так и целлюлоза построены из повторяющихся звеньев D-глюкозы, но они различаются типом гликозидной связи и из-за этого характеризуются совершенно разными свойствами и выполняют разные биологические функции.

7.1. Моносахариды и дисахариды

Самые простые углеводы — моносахариды; по химической природе это альдегиды или кетоны с двумя или большим числом гидроксильных групп; шестиуглеродные моносахариды глюкоза и фруктоза содержат по пять гидроксильных групп. Атомы углерода, несущие гидроксильные группы, могут быть хиральными центрами, поэтому у природных сахаров много стереоизомеров. Мы начнем с описания семейств моносахаридов, углеродный скелет которых содержит от трех до семи атомов углерода, и обсудим их структуру, стереоизомерные формы, а также способы графического изображения их трехмерных структур. Затем перейдем к рассмотрению некоторых химических реакций с участием карбонильных групп моносахаридов. Одна из таких реакций — присоединение гидроксильной группы из той же самой молекулы, что приводит к образованию циклических форм пяти- и шестиуглеродных сахаров (именно эти формы преобладают в водных растворах) и возникновению новых хиральных центров, что еще больше усложняет стереохимические свойства этого класса веществ. В связи с этим мы довольно подробно остановимся на номенклатуре, используемой для однозначного определения положения каждого атома углерода в циклической структуре, а также на способах графического изображения этих структур. Данная информация будет полезной при обсуждении метаболизма моносахаридов в части II. Кроме того, мы познакомим читателя с некоторыми важными производными моносахаридов, речь о которых пойдет далее.

Существует два семейства моносахаридов — альдозы и кетозы

Моносахариды — бесцветные кристаллические вещества, они легко растворяются в воде, но не растворяются в неполярных растворителях. Большинство моносахаридов имеет сладкий вкус. Углеродный остов типичных моносахаридов образует неразветвленную цепь, в которой все атомы углерода связаны между собой одинарными связями. В открытой форме молекулы

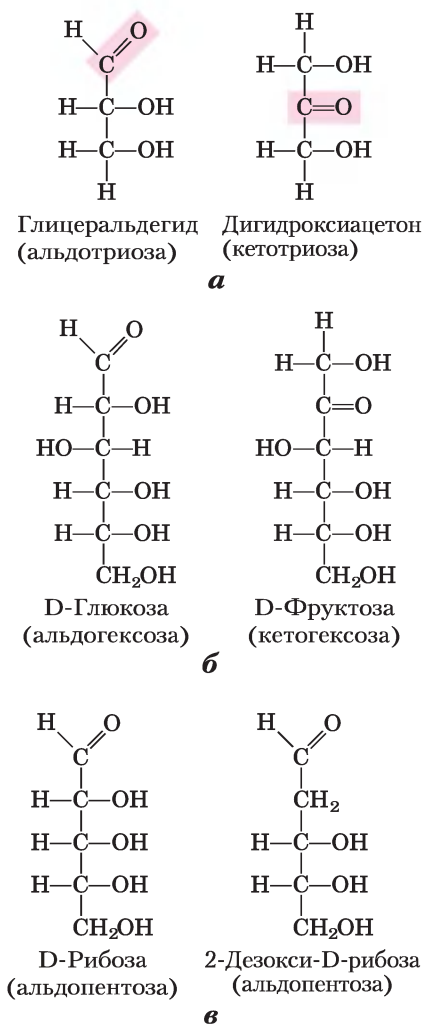


Рис. 7-1. Представители моносахаридов. а) Две триозы — альдоза и кетоза. Карбонильная группа каждого соединения выделена цветом. б) Две часто встречающиеся гексозы. в) Пентозы — компоненты нуклеиновых кислот. D-рибоза входит в состав рибонуклеиновых кислот (РНК), а 2-дезоксид-рибоза является компонентом дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК).

один из атомов углерода связан двойной связью с атомом кислорода, т. е. входит в состав карбонильной группы; все остальные атомы углерода несут гидроксильные группы. Если карбонильная группа расположена на конце углеродной цепи (альдегидная группа), то такой моносахарид называется **альдозой**; если карбонил занимает любое другое положение (кетонная группа), моносахарид называется **кетозой**. Самые простые моносахариды содержат по три атома углерода; это два трехуглеродных сахара — альдотриоза глицеральдегид и кетотриоза дигидроксиацетон (рис. 7-1, а).

Моносахариды с четырьмя, пятью, шестью и семью атомами углерода называются тетрозами, пентозами, гексозами и гептозами соответственно. Каждый из таких моносахаридов может существовать как в форме альдегида, так и в форме кетона, образуя альдотетрозы и кетотетрозы, альдопентозы и кетопентозы, альдогексозы и кетогексозы и т. д. Гексозы, к которым относятся альдогексоза D-глюкоза и кетогексоза D-фруктоза (рис. 7-1, б), — наиболее распространенные в природе моносахариды. Альдопентозы D-рибоза и 2-дезоксид-рибоза (рис. 7-1, в) входят в состав нуклеотидов и нуклеиновых кислот (гл. 8).

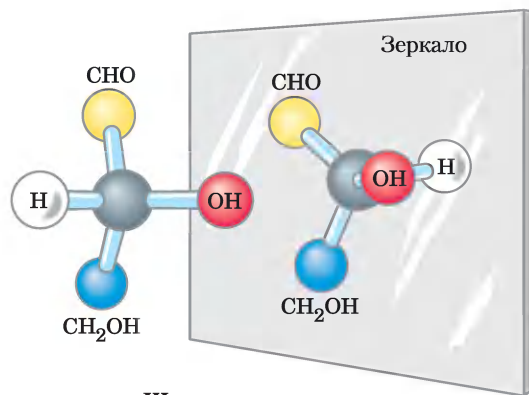
Моносахариды содержат асимметрические атомы

Все моносахариды, за исключением дигидроксиацетона, содержат один или несколько асимметрических (хиральных) атомов углерода и существуют в виде оптически активных изомерных форм (с. 36–38). Самая простая альдоза глицеральдегид имеет один хиральный центр (средний атом углерода) и, следовательно, может присутствовать в виде двух оптических изомеров, или **энантиомеров** (рис. 7-2).

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Правовращающая форма называется D-изомером, левовращающая — L-изомером. Как и в случае других биомолекул с хиральными центрами, абсолютная конфигурация сахаров может быть определена методом рентгеновской кристаллографии. Для изображения трехмерной структуры сахаров на плоскости чаще всего используют **проекционные формулы Фишера** (рис. 7-2). В проекционных формулах Фишера горизонтальные линии изо-

бражают связи, выходящие из плоскости листа по направлению к читателю; вертикальные линии изображают связи, уходящие за плоскость листа — в сторону от читателя.

В общем случае, молекулы, содержащие n хиральных центров, могут иметь 2^n стереоизомеров. Глицеральдегид имеет $2^1 = 2$ изомера; у альдогексозы с четырьмя хиральными центрами $2^4 = 16$ стереоизомеров. Стереои́зомеры моно-



Шаростержневая модель

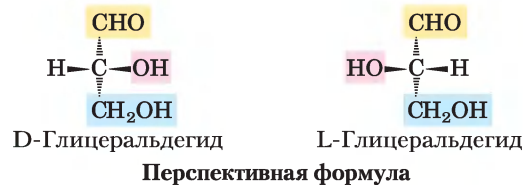
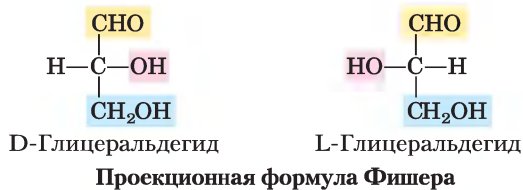
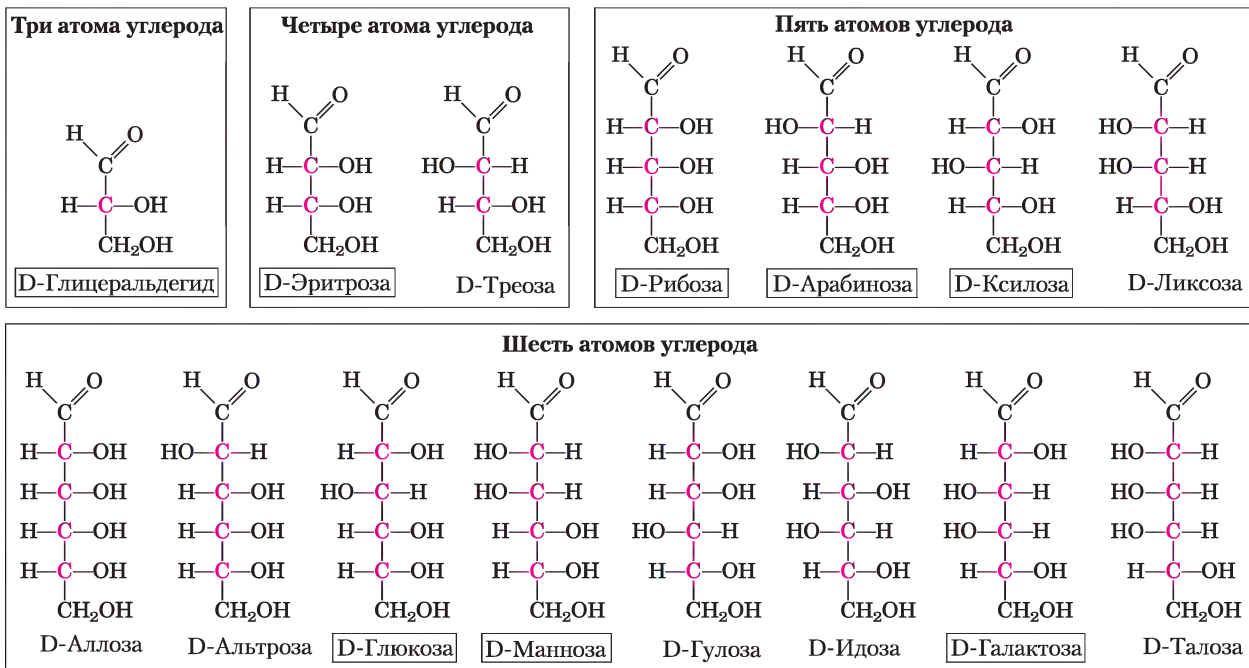
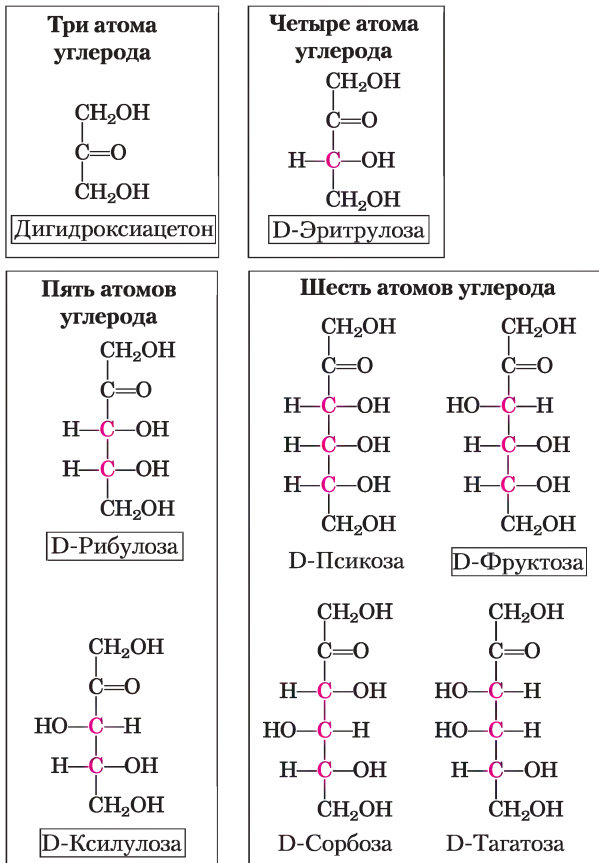


Рис. 7-2. Три способа изображения двух стереоизомеров глицеральдегида. Формулы стереоизомеров представляют собой зеркальные отражения друг друга. Шаростержневая модель больше соответствует реальной конфигурации молекул. По договоренности, в проекционных формулах Фишера горизонтальными линиями изображают связи, выступающие над плоскостью листа по направлению к читателю; вертикальными линиями изображают связи, уходящие за плоскость листа в сторону от читателя. Вспомните (рис. 1-17), что при перспективном изображении формул связи, направленные к читателю, изображаются закрашенными стрелками, а уходящие от него — пунктирными стрелками.



D-Альдозы

a



D-Кетозы

б

Рис. 7-3. Альдозы и кетозы. С помощью проекционных формул изображены структуры молекул D-альдоз (а) и D-кетоз (б), имеющих от трех до шести атомов углерода. Красным цветом выделены хиральные атомы углерода. Во всех D-изомерах хиральный атом углерода, наиболее удаленный от карбонильного атома углерода, имеет такую же конфигурацию, как хиральный атом углерода в молекуле D-глицеральдегида. Названия наиболее часто встречающихся в природе сахаров обведены рамкой.

сахаридов с разной длиной углеродной цепи можно разделить на две группы, отличающиеся конфигурацией при хиральном центре, наиболее удаленном от карбонильной группы. Те изомеры, конфигурация при хиральном углероде которых соответствует конфигурации D-глицеральдегида, называют D-изомерами, а те, что имеют конфигурацию, как у L-глицеральдегида, — L-изомерами. Если гидроксильная группа при углероде в проекционной формуле изображена справа, данный сахар — D-изомер, если слева, это L-изомер. Из 16 возможных альдогексоз восемь L-изомеры, а восемь — D-изомеры. Большинство гексоз, встречающихся в живых организмах, представляют собой D-изомеры.

На рис. 7-3 представлены структурные формулы D-стереоизомеров всех альдоз и кетоз,

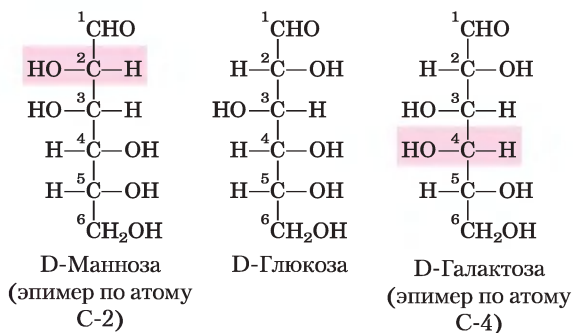
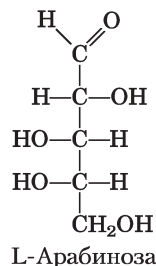


Рис. 7-4. Эпимеры. D-глюкоза и два ее эпимера изображены с помощью проекционных формул Фишера. Каждый эпимер отличается от D-глюкозы конфигурацией одного хирального центра (выделен цветом).

углеродный остов молекул которых состоит из трех–шести атомов. Атомы углерода в молекулах сахаров нумеруют, начиная с того конца цепи, который расположен ближе к карбонильной группе. Каждая из восьми D-альдогексоз, различающихся стереохимией атомов C-2, C-3 и C-4, имеет свое собственное название: D-глюкоза, D-галактоза, D-манноза и т. д. (рис. 7-3, а). Названия четырех- и пятиуглеродных кетоз образуют добавлением суффикса «ул» к названиям соответствующих альдоз. Например, D-рибулоза — это кетопентоза, соответствующая альдопентозе D-рибозе. Названия кетогексоз образуются другим способом: например, фруктоза происходит от лат. *fructus*, что означает фрукт, поскольку фрукты богаты этим сахаром, а сорбоза — от лат. *sorbus*, что означает рябина, ягоды которой содержат родственный сахароспирт сорбитол. Два сахара, различающиеся между собой только конфигурацией одного атома углерода, называют **эпимерами**. Так, эпимерами являются D-глюкоза и D-манноза, отличающиеся

только стереохимией атома углерода C-2, а также D-глюкоза и D-галактоза, различающиеся стереохимией углерода C-4 (рис. 7-4).

Некоторые сахара встречаются в природе в L-форме. Примером может служить L-арабиноза и L-изомеры некоторых производных сахаров, входящих в состав гликоконъюгатов (разд. 7-3).



Обычные моносахариды имеют циклическую структуру

Для простоты мы до сих пор изображали все альдозы и кетозы как линейные молекулы (рис. 7-3, 7-4). На самом же деле в водном растворе альдотетрозы и все моносахариды с большим числом атомов углерода в цепи преимущественно существуют в виде циклических (кольцевых) молекул, в которых карбонильная группа образует ковалентную связь с кислородом гидроксильной группы той же молекулы. Образование таких кольцевых структур — это частный случай реакции между спиртами и альдегидами или кетонами, приводящей к образованию **полуацеталей** и **полукеталей** (рис. 7-5), которые содержат еще один асимметрический атом и, следовательно, могут находиться в двух стереоизомерных формах. Например, D-глюкоза существует в растворе в виде внутримолекулярного полуацетала,

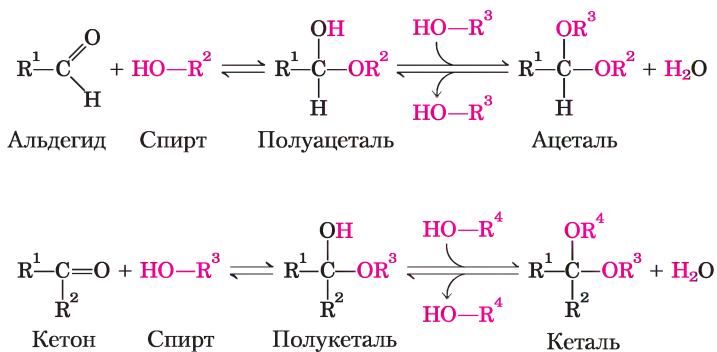


Рис. 7-5. Образование полуацеталей и полукеталей. Альдегиды и кетоны могут взаимодействовать со спиртами в соотношении 1:1, образуя при этом полуацетали и полукетали соответственно, содержащие дополнительный хиральный центр. Присоединение второй молекулы спирта приводит к образованию ацеталей и кеталей. Если вторая спиртовая группа является частью молекулы другого сахара, то образующаяся связь называется гликозидной связью.

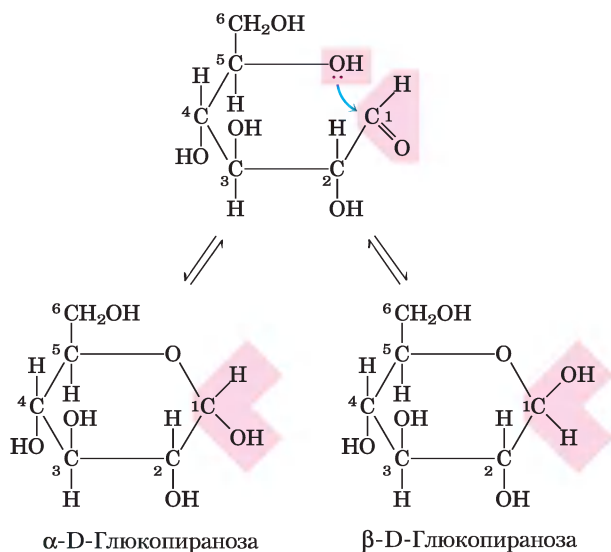
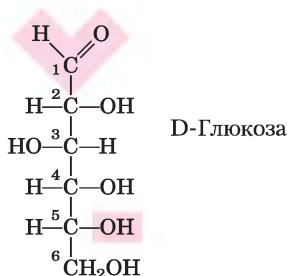


Рис. 7-6. Образование двух циклических форм D-глюкозы. Реакция между альдегидной группой у атома C-1 и гидроксильной группой у атома C-5 приводит к образованию полуацеталля, имеющего два стереоизомера (α - и β -аномеры) с разной стереохимией только при углеводе C-1. Взаимные превращения α - и β -аномеров называют мутаротацией.

в котором свободная гидроксильная группа у атома C-5 прореагировала с альдегидной группой у атома C-1, в результате чего атом C-1 стал асимметрическим; два образующихся стереоизомера обозначают буквами α и β (рис. 7-6). Подобные шестичленные кольца называют **пиранозами**, поскольку они напоминают шестичленный цикл пирана (рис. 7-7). По систематической номенклатуре D-глюкоза образует две кольцевые структуры — α -D-глюкопиранозу и β -D-глюкопиранозу.

Альдогексозы могут существовать и в другой циклической форме (пятичленное кольцо). Такие структуры из-за сходства с пятичленным

циклом фурана называют **фуранозами**. Шестичленные альдопиранозные циклы гораздо более устойчивы, чем альдофуранозные, и поэтому преобладают в растворах альдогексоз. Пиранозные циклы могут образовывать только те альдозы, в молекулах которых содержится более пяти атомов углерода.

Изомерные формы моносахаридов, различающиеся лишь конфигурацией полуацетального или полукетального атома углерода, называют **аномерами**, а полуацетальный (карбонильный) атом углерода называют аномерным. В растворе α - и β -аномерные формы переходят друг в друга в процессе **мутаротации** (рис. 7-6). Таким образом, растворы α -D-глюкозы и β -D-глюкозы в конце концов образуют равновесную смесь с оптической активностью, которая состоит приблизительно из одной трети α -D-глюкозы и двух

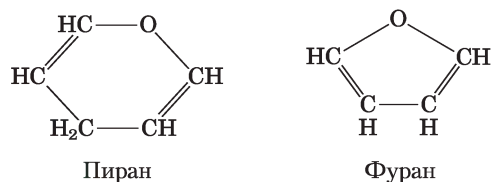
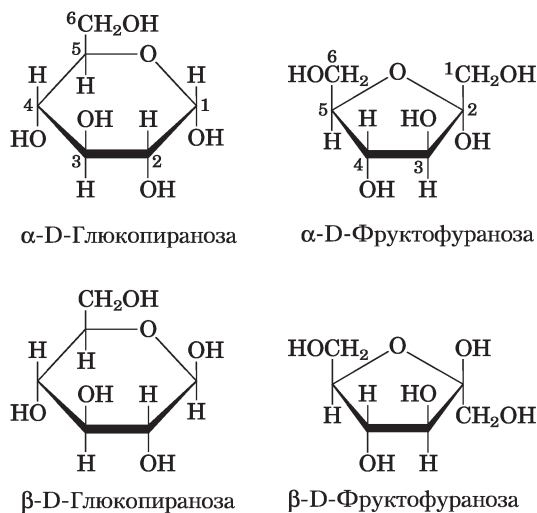


Рис. 7-7. Пиранозы и фуранозы. Проекционные формулы Хеурса (пиранозных форм D-глюкозы и фуранозных форм D-фруктозы). Сторона цикла ближе к читателю показана толстой линией. Гидроксильные группы, расположенные в данных формулах под плоскостью цикла, соответствуют тем, что расположены справа в проекционных формулах Фишера (ср. рис. 7-6). Внизу для сравнения представлены формулы пирана и фурана.

третьей β -D-глюкозы; кроме того, очень небольшое количество глюкозы присутствует в виде линейной формы и в виде пятичленного кольца (глюкофуранозы).

Кетогексозы также существуют в виде α - и β -аномеров. В этих соединениях гидроксильная группа у атома С-5 (или С-6) реагирует с кетогруппой у атома С-2, что приводит к образованию фуранозного (или пиранозного) кольца, содержащего полукетальную связь (рис. 7-5). D-Фруктоза легко образует фуранозные циклы (рис. 7-7); наиболее распространенной аномерной формой этого сахара является β -D-фруктофураноза.

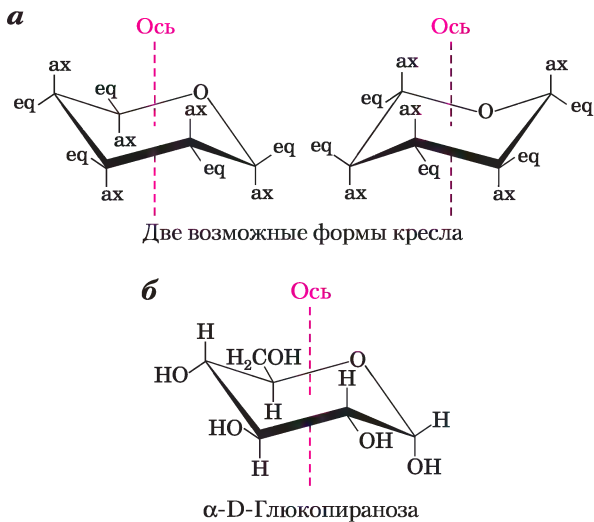


Рис. 7-8. Конформационные формулы пиранозы.

а) Две возможные конформации кресла пиранозного кольца. Заместители у атомов углерода в кольце могут быть либо аксиальными (*ax*) — расположены параллельно вертикальной оси, проходящей через кольцо, либо экваториальными (*eq*) — расположены примерно перпендикулярно к направлению оси. Две конформации, изображенные на рисунке, не могут свободно переходить одна в другую без разрыва кольца. Однако по данным исследования методом атомно-силовой микроскопии (см. доп. 11-1) энергия примерно 46 кДж/моль сахара может обеспечить взаимопревращения этих двух форм. В общем случае заместители в экваториальных положениях меньше подвержены стерическим воздействиям соседних групп, поэтому, если в молекуле имеются объемные заместители, то предпочтение отдается конформеру, у которого они расположены в экваториальной позиции. Еще одна возможная конформация — ванна (здесь не показана) — наблюдается только в молекулах с очень громоздкими заместителями. **б**) α -D-Глюкопираноза в наиболее выгодной конформации кресла.

Для изображения циклических форм моносахаридов обычно используют **проекционные формулы Хеурса** (рис. 7-7). Следует иметь в виду, что шестичленное пиранозное кольцо не лежит в одной плоскости, как представляет проекция Хеурса, а имеет форму кресла (рис. 7-8). Вспомните (из гл. 1), что *конформациями* называются различные формы молекулы, которые она может принимать без разрыва ковалентной связи, в то время как *конфигурациями* — это состояния молекулы, взаимные переходы между которыми возможны только при разрыве ковалентной связи. Так, взаимный переход между α - и β -конфигурациями осуществляется с разрывом связи у атома кислорода в составе кольца. Как мы увидим далее, биологические свойства и функции многих полисахаридов в значительной степени определяются особенностями конформаций их моносахаридных звеньев.

Живые организмы содержат множество производных гексозы

Кроме простых гексоз, таких как глюкоза, галактоза и манноза, существует ряд производных, в которых либо гидроксильная группа исходного соединения заменена другой, либо атом углерода окислен до карбоксильной группы (рис. 7-9). В глюкозамине, галактозамине и маннозамине гидроксил у атома С-2 в исходной молекуле сахара заменен аминогруппой. Аминогруппа практически всегда конденсирована с уксусной кислотой, например как в N-ацетилглюкозамине. Это соединение входит в состав многих структурных полимеров, в том числе и тех, что образуют клеточную стенку бактерий. Последняя содержит еще одно производное глюкозамина — N-ацетилмуравовую кислоту. В этом соединении кислород у атома С-3 N-ацетилглюкозамина связан эфирной связью с молочной кислотой (одной из трехуглеродных карбоновых кислот). Замена гидроксильной группы на водород у атома С-6 в молекуле L-галактозы или L-маннозы приводит к образованию L-фукозы или L-рамнозы соответственно. L-фукоза обнаружена в сложных олигосахаридных компонентах гликопротеинов и гликолипидов, а L-рамноза — в растительных полисахаридах.

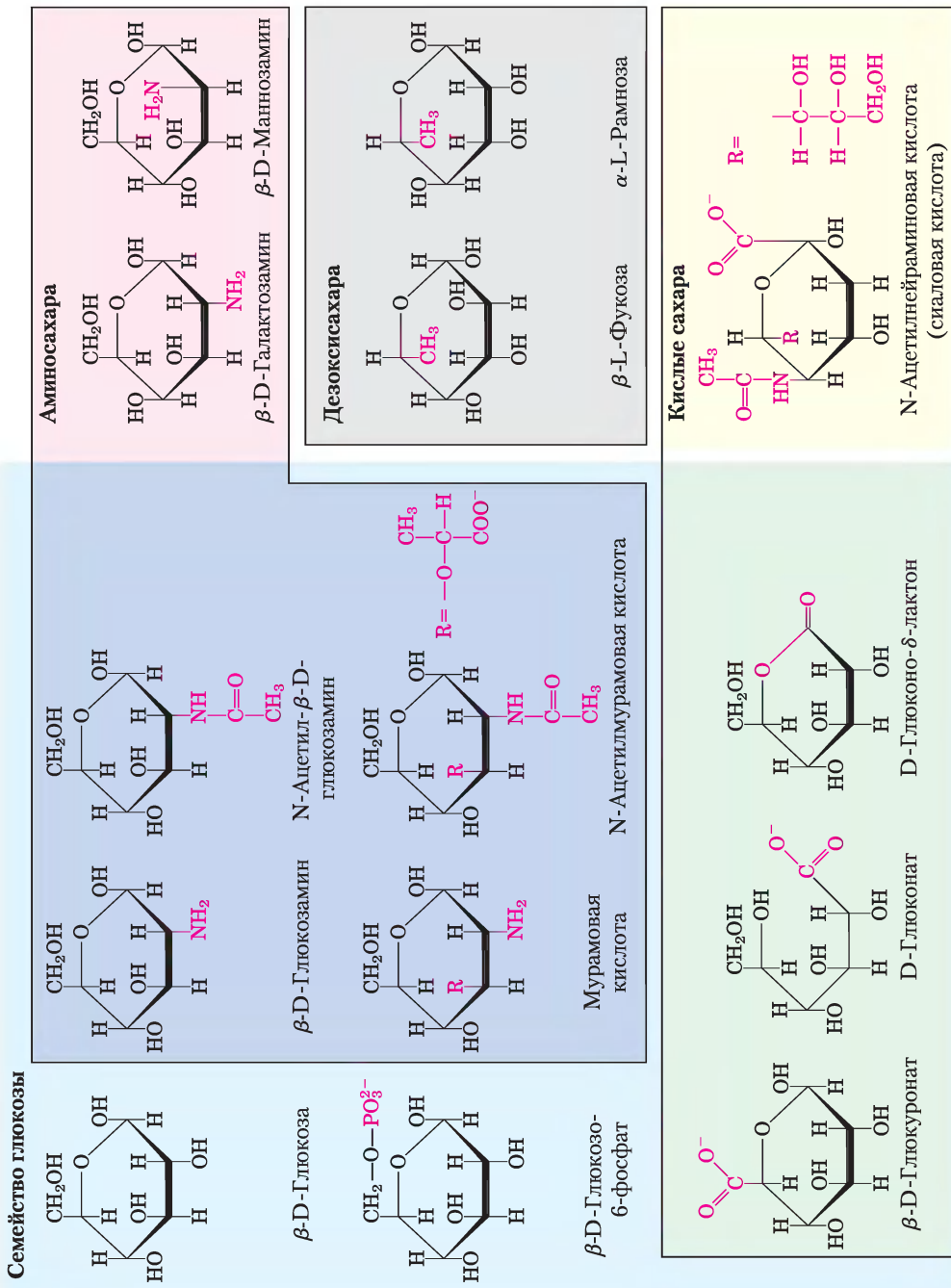



Рис. 7-9. Производные гексоз, имеющие важное биологическое значение. В аminosахарах одна из -ОН-групп гексозы замещается на -NH₂. При замене -ОН на -Н возникают дезокси-сахара; эти дезоксисахара встречаются в природе в виде L-изомеров. Кислые сахара содержат карбоксильную группу, благодаря чему при нейтральных pH несут отрицательный заряд. D-Глюконо- δ -лактон образуется в результате возникновения эфирной связи между карбоксильной и гидроксильной группами у атома углерода C-5 (δ -углерода) в D-глюконате.

Окисление карбонильного (альдегидного) углерода глюкозы до карбоксильной группы приводит к образованию глюконовой кислоты; при окислении других альдоз образуются соответствующие **альдоновые кислоты**. Окисление углерода на противоположном конце молекулы (атома С-6 глюкозы, галактозы или маннозы) ведет к образованию соответствующих **уроновых кислот** — глюкуроновой, галактуроновой или маннуровой. Как альдоновые, так и уроновые кислоты образуют устойчивые внутримолекулярные эфиры — **лактоны** (рис. 7-9, слева внизу). Кроме перечисленных кислых производных гексоз стоит упомянуть один девятиуглеродный сахар — N-ацетилнейраминовую кислоту (одна из сиаловых кислот, часто называемая просто сиаловой кислотой). N-ацетилнейраминовая кислота представляет собой производное N-ацетилманнозамина и входит в состав многих гликопротеинов и гликолипидов в клетках животных. Карбоксильные группы кислых производных сахаров при pH 7,0 ионизованы, поэтому эти соединения следует называть по аналогии с карбоксилатами — глюкуронат, галактуронат и т. д.

Интермедиатами в синтезе и при метаболизме углеводов очень часто являются не сахара, а их фосфорилированные производные. Реакция конденсации фосфорной кислоты с одной из гидроксильных групп сахара приводит к образованию эфира фосфорной кислоты, например глюкозо-6-фосфата (рис. 7-9). Фосфаты сахаров довольно устойчивы при нейтральных значе-

ниях pH и несут на себе отрицательный заряд. Одним из результатов фосфорилирования является удерживание сахаров в клетке; в большинстве клеток отсутствуют системы транспорта фосфорилированных сахаров через плазматическую мембрану. Кроме того, фосфорилирование активирует сахара для дальнейших химических превращений. Некоторые фосфорилированные производные сахаров являются важными компонентами нуклеотидов (они обсуждаются в следующей главе).

Моносахариды — это восстановители

 Моносахариды окисляются довольно мягкими окислителями, например ионами Fe^{3+} или Cu^{2+} (рис. 7-10). При этом карбонильная группа окисляется до карбоксильной. Глюкозу и другие сахара, способные восстановить ионы Fe^{3+} или Cu^{2+} , называют **восстанавливающими** сахарами. Они образуют ендиолы, которые превращаются в альдоновые кислоты, а затем в сложную смесь 2-, 3-, 4- и 6-углеродных кислот. Это свойство лежит в основе нескольких методов количественного определения восстанавливающих сахаров. Измеряя количество окислителя, восстановленного раствором сахара, можно определить концентрацию сахара. Многие годы подобные тесты использовались для обнаружения и количественного определения глюкозы в крови и моче при диагностике сахарного диабета (доп. 7-1). ■

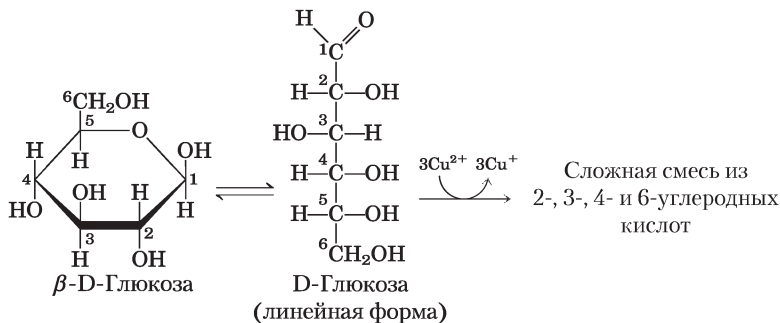


Рис. 7-10. Сахара как восстанавливающие агенты. В реакции Фелинга происходит окисление аномерного атома углерода в молекуле глюкозы или других сахаров. В щелочных условиях ионы меди Cu^{+} образуют осадок оксида меди красного цвета. В форме полуацетала (в циклической форме) атом С-1 глюкозы не окисляется ионами Cu^{2+} . Однако между линейной и циклической формами существует равновесие, поэтому в конечном итоге реакция проходит до конца. Взаимодействие с ионами Cu^{2+} сложное, приводит к образованию смеси продуктов и требует 3 моль Cu^{2+} на 1 моль глюкозы.



Глюкоза является основным источником энергии для головного мозга. Нарушение снабжения мозга глюкозой может иметь угрожающие последствия: летаргическое состояние, кома, необратимое повреждение мозга и смерть (рис. 23–25). У животных существует сложный гормональный механизм, обеспечивающий достаточно высокое содержание глюкозы в крови (около 5 мМ), чтобы удовлетворять потребностям головного мозга, но не слишком высокое, поскольку избыток глюкозы в крови может также приводить к серьезным физиологическим последствиям.

В организме людей, страдающих инсулинозависимым сахарным диабетом, производится недостаточное количество гормона инсулина, который в норме служит для снижения концентрации глюкозы в крови. При отсутствии лечения концентрация глюкозы в крови больных диабетом может превысить норму в несколько раз. Высокое содержание глюкозы в крови является одной из причин таких серьезных последствий прогрессирующего диабета, как почечная недостаточность, сердечно-сосудистые заболевания, слепота, а также приводит к нарушению процесса заживления ран. Поэтому одной из задач при лечении диабета является обеспечение достаточного уровня инсулина в организме (путем инъекций), что обуславливает поддержание нормального уровня глюкозы крови. Для определения оптимального рациона питания, физической нагрузки и программы

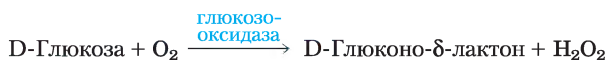


Рис. 1. Реакция, катализируемая глюкозооксидазой, используется для определения концентрации глюкозы в крови. Второй фермент — пероксидаза — катализирует реакцию H_2O_2 с бесцветным субстратом, приводящую к образованию окрашенного продукта, концентрацию которого измеряют с помощью спектрофотометра.

введения препарата необходимо несколько раз в день измерять концентрацию глюкозы в крови и соответствующим образом корректировать вводимую дозу инсулина.

Концентрацию глюкозы в крови можно измерить, используя простую методику определения концентрации восстанавливающих сахаров, например, по методу Фелинга; эта методика многие годы применялась в качестве диагностического теста при подозрении на диабет (рис. 7–10). Для современного анализа требуется лишь капля крови, которую помещают на тест-полоску с глюкозооксидазой (рис. 1). Развитие окраски при реакции красителя с H_2O_2 , выделяющейся в результате ферментативной реакции, регистрируют на простом фотометре; концентрацию глюкозы в крови определяют по градуировочному графику, который уже вложен в прибор.

Уровень глюкозы крови меняется после еды и интенсивной физической нагрузки, так что одно измерение, как правило, не отражает *среднюю* концентрацию глюкозы за сутки или за несколько дней, и опасное превышение нормы может оказаться незамеченным. Среднюю концентрацию глюкозы можно установить путем изучения состояния гемоглобина — переносящего кислород белка, содержащегося в эритроцитах (с. 233). Функция этого белка-переносчика в мембране эритроцита состоит в выравнивании концентрации глюкозы внутри клеток и в плазме крови, так что гемоглобин постоянно доступен для связывания с глюкозой, вне зависимости от ее концентрации в крови. Между глюкозой и первичной аминокислотной группой гемоглобина (аминогруппа N-концевого остатка валина или ϵ -аминогруппа остатка лизина; см. рис. 2) происходит неферментативная реакция. Скорость этой реакции пропорциональна концентрации глюкозы, так что эту реакцию можно использовать для оценки средней концентрации глюкозы в крови за несколько недель. Содержание гликированного гемоглобина (GHb) в каж-

Дисахариды содержат гликозидную связь

Дисахариды (мальтоза, лактоза, сахароза) состоят из двух моносахаридов, связанных между собой ковалентной **О-гликозидной связью**, образующейся при взаимодействии гидроксильной группы одной молекулы сахара с аномерным атомом углерода другой молекулы (рис. 7–11). При этом из полуацетала (например, глюкопирано-

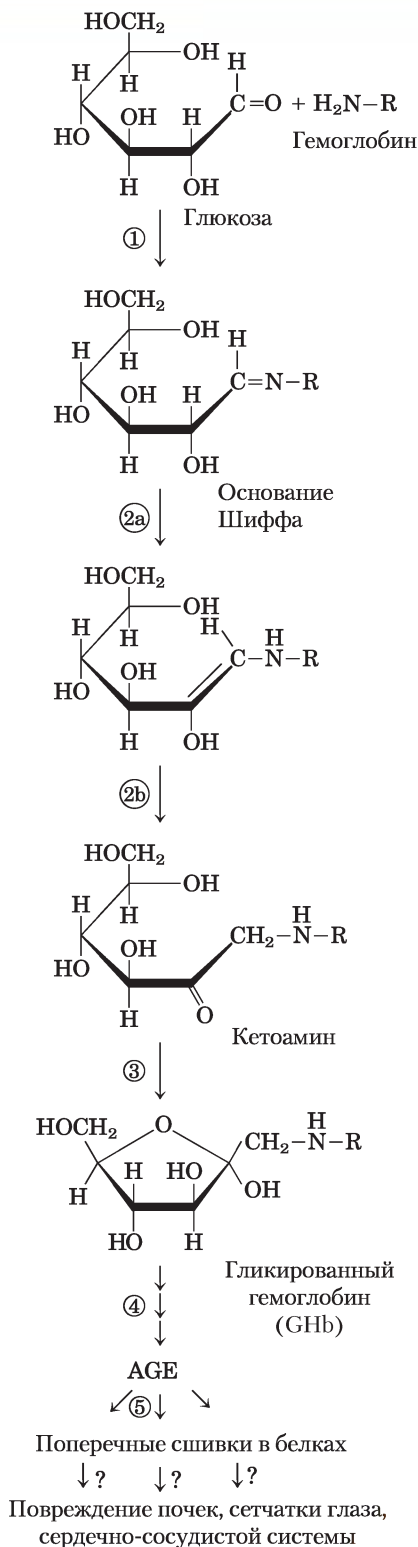
зы) и спирта (гидроксильной группы второй молекулы сахара) образуется ацеталь (рис. 7–5). Гликозидные связи легко гидролизуются в кислой среде, но устойчивы к действию оснований. При кипячении в разбавленной кислоте дисахариды гидролизуются, высвобождая моносахаридные компоненты. **Н-гликозидная связь** соединяет аномерный атом углерода

дый момент времени отражает среднюю концентрацию глюкозы в крови для периода, соответствующего продолжительности жизни эритроцита (около 120 дней), хотя при установлении уровня ГНб наиболее важен показатель для двух последних недель.

Степень **гликирования гемоглобина** (гликированием, в отличие от гликозилирования, называют *неферментативный* перенос глюкозы на молекулу белка) в клинической практике измеряют путем экстракции гемоглобина из небольшого образца крови и электрофоретического разделения ГНб и немодифицированного гемоглобина (разделение основано на том, что после модификации аминогруппы в гликированном гемоглобине и в немодифицированном гемоглобине несут разный заряд). В норме ГНб составляет около 5% общего содержания гемоглобина (что соответствует концентрации глюкозы в крови 120 мг / 100 мл). У больных диабетом в отсутствие лечения это значение может достигать 13%, что отражает повышение концентрации глюкозы в крови до опасного уровня 300 мг / 100 мл. Один из критериев правильного выбора индивидуальной программы введения инсулина (время инъекции, частота введения и доза) — это поддержание ГНб на уровне 7%.

В процессе гликирования гемоглобина за первой стадией реакции (образование основания Шиффа) следует ряд перегруппировок с окислением и отщеплением молекул воды, что приводит к образованию гетерогенной смеси продуктов AGE (*advanced glycation end products*). Эти продукты могут выходить из эритроцитов и образовывать перекрестные сшивки с белками, мешая нормальному функционированию белков (рис. 2). Накопление сравнительно большого количества AGE у больных диабетом может приводить к нарушению работы почек, сетчатки глаза и сердечно-сосудистой системы. Ведется поиск лекарственных препаратов, способных воздействовать на этот разрушительный для организма процесс.

Рис. 2. Неферментативная реакция глюкозы с первичной аминогруппой в гемоглобине: 1) образование основания Шиффа; 2) перегруппировка Амадори с образованием устойчивого продукта; 3) циклизация кетоамина с образованием ГНб; 4) в последующих реакциях возникают конечные продукты гликирования (AGE), такие как ϵ -N-карбоксиметиллизин и метилглиоксаль; 5) эти вещества могут мешать функционированию других белков, образуя с ними перекрестные сшивки, что вызывает серьезные патологические изменения в организме.



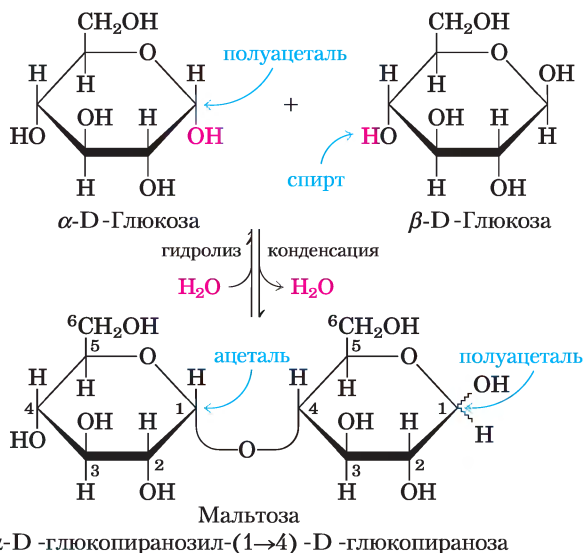


Рис. 7-11. Образование мальтозы. Дисахарид образуется из двух моносахаридов (в данном случае двух молекул D-глюкозы), причем –ОН-группа (спиртовая) одной молекулы глюкозы (*справа*) реагирует с внутримолекулярным полуацеталем другой молекулы (*слева*) с высвобождением молекулы H_2O и образованием O-гликозидной связи. При обратной реакции (гидролизе) гликозидная связь атакуется молекулой воды. Мальтоза сохраняет восстанавливающие свойства, поскольку один ее аномерный атом C-1 не участвует в гликозидной связи. При мутаротации происходят взаимопревращения α - и β -форм полуацетала (что иногда, как здесь, изображают волнистой линией), таким образом, этот остаток мальтозы может находиться и в α -, и в β -формах.

сахара с атомом азота в гликопротеинах (рис. 7-29) и нуклеотидах (рис. 8-1).

Аномерный атом углерода окисляется ионами Fe^{3+} или Cu^{2+} (реакция на восстанавливающие сахара) только в линейной молекуле, находящейся в равновесии с циклической формой. Если аномерный атом участвует в образовании гликозидной связи, то остаток сахара не может перейти в линейную форму и становится невозстанавливающим. В дисахаридах и в целом в полисахаридах конец углеводной цепи, на котором расположен свободный аномерный атом углерода (не связанный гликозидной связью), называют **восстанавливающим концом**.

Дисахарид мальтоза (рис. 7-11) состоит из двух остатков D-глюкозы, соединенных гликозидной связью между C-1 (аномерным атомом) одного остатка глюкозы и C-4 другого остатка. Поскольку в этом дисахариде сохраняется свободный аномерный атом (C-1 в правом остатке глюкозы на рис. 7-11), мальтоза является восстанавливающим сахаром. Аномерный атом углерода в гликозидной связи имеет α -конфигурацию. Второй остаток глюкозы со свободным аномерным атомом углерода может существовать как в α -, так и в β -формах.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Существуют определенные правила, в соответствии с которыми следует называть восстанавливающие дисаха-

Таблица 7-1			
Обозначения и сокращения некоторых моносахаридов и их производных			
Абеквоза	Abe	Галактозамин	◻ GalN
Арабиноза	Ara	Глюкозамин	◼ GlcN
Галактоза	◉ Gal	Глюкуроновая кислота	◊ GlcA
Глюкоза	● Glc	N-Ацетилгалактозамин	◻ GalNAc
Ксилоза	★ Xyl	N-Ацетилглюкозамин	◼ GlcNAc
Манноза	● Man	Идуоновая кислота	◊ IdoA
Рамноза	Rha	Мурамовая кислота	Mur
Рибоза	Rib	N-Ацетилмурамовая кислота	Mur2Ac
Фруктоза	Fru	N-Ацетилнейраминовая (сиаловая) кислота	◊ Neu5Ac
Фукоза	▲ Fuc		

Внимание: обычно гексозы изображают кружочком, N-ацетилгексозамины — квадратиком, а гексозамины — кружком, разделенным по диагонали. Все сахара с «глюко» конфигурацией — синие, с «галакто» конфигурацией — желтые, с «манно» — зеленые. Другие заместители добавляют к названию по мере необходимости: сульфат (S), фосфат (P), O-ацетил (OAc) или O-метил (Ome).

риды, такие как мальтоза и в особенности более сложные олигосахариды. По договоренности, название относится к соединению, в котором невосстанавливающий конец молекулы расположен слева; при этом поступают следующим образом. 1) Определяют конфигурацию (α или β) аномерного углерода, связывающего первый моносахаридный остаток (слева) со вторым. 2) Называют невосстанавливающий остаток; для пяти- и шестичленных кольцевых структур используют корень «фурано» или «пирано» соответственно. 3) В скобках указывают положения двух атомов углерода, соединенных гликозидной связью, и между этими цифрами ставят стрелку; например, запись (1 \rightarrow 4) означает, что С-1 в первом остатке сахара соединен с С-4 во втором. 4) Называют второй остаток. Если существует и третий остаток, то вторую гликозидную связь описывают по тем же правилам. Для сокращения названий сложных полисахаридов используют трехбуквенные обозначения моносахаридных звеньев, как показано в табл. 7-1. В соответствии с правилами обозначения олигосахаридов мальтозу будет правильно назвать α -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)-D-глюкопираноза. Поскольку большинство сахаров, о которых пойдет речь в данной книге, являются D-сахарами, а преобладающей формой гексоз является пиранозная, то мы обычно сокращаем формальное название таких соединений, указывая только конфигурацию аномерного углерода и номера соединенных гликозидной связью атомов. При таком способе обозначений мальтоза будет выглядеть как Glc(α 1 \rightarrow 4)Glc. ■

Дисахарид лактоза (рис. 7-12), который при гидролизе распадается на D-галактозу и D-глюкозу, в природе встречается только в молоке. Аномерный атом глюкозного остатка доступен для окисления, поэтому лактоза представляет собой восстанавливающий дисахарид, сокращенная запись: Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc. Сахароза (столовый сахар) — это дисахарид, состоящий из глюкозы и фруктозы. Сахароза образуется в клетках растений, но не в клетках животных. В отличие от мальтозы и лактозы в сахарозе нет свободного аномерного атома; аномерные атомы углерода обоих моносахаридных остатков участвуют в образовании гликозидной связи (рис. 7-12). Следовательно, сахароза не является восстанавливающим сахаром. Невосстанавлива-

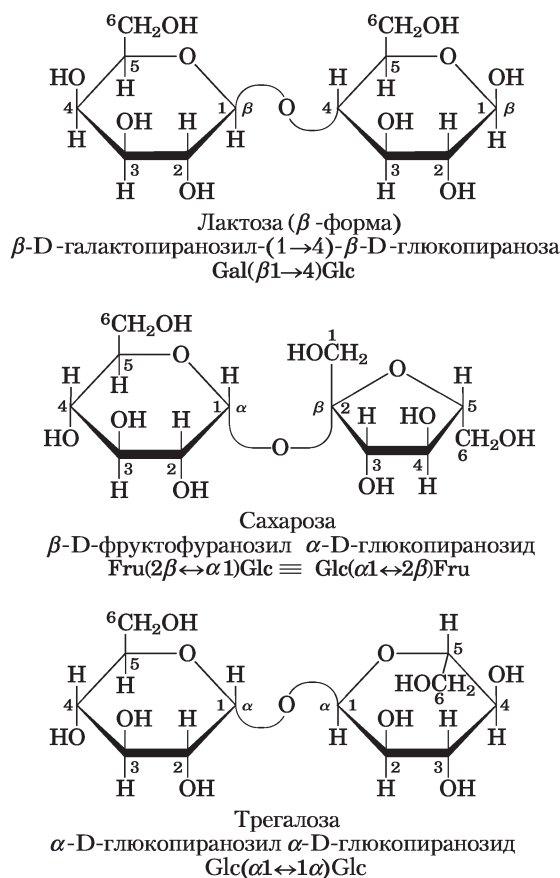


Рис. 7-12. Некоторые часто встречающиеся дисахариды. Здесь, как и на рис. 7-11, молекулы изображены с помощью проекционных формул Хеурса. Для каждого дисахариды приведены тривиальное, полное систематическое и сокращенное названия. По формальным признакам глюкоза — исходный гликозид для сахарозы, обычно ее изображают, как здесь, с остатком глюкозы слева.

ющие сахара обозначаются как гликозиды, причем в данном случае гликозидной связью соединены аномерные атомы углерода. В сокращенном названии номера и конфигурации аномерных атомов соединены двунаправленной стрелкой. Например, для сахарозы: Glc(α 1 \leftrightarrow 2 β)Fru или Fru(β 2 \leftrightarrow 1 α)Glc. Сахароза — основной промежуточный продукт фотосинтеза; во многих растениях доставка сахара от листьев к другим тканям осуществляется именно в форме сахарозы. Трегалоза Glc(α 1 \leftrightarrow 1 α)Glc (рис. 7-12) — это дисахарид, построенный из остатков D-глюкозы и, подобно сахарозе, не имеющий восстанавливающей активности. Трегалоза является основным компонентом жидкости, циркулирующей в орга-

низме насекомых (гемолимфы), где она служит в качестве запасного источника энергии. Грибы тоже содержат трегалозу, из них этот сахар получают промышленным способом.

Краткое содержание раздела 7.1 МОНОСАХАРИДЫ И ДИСАХАРИДЫ

- Сахара (или сахариды) — соединения, содержащие альдегидную или кетонную группу и две или большее число гидроксильных групп.
- Моносахариды обычно содержат несколько хиральных атомов углерода и поэтому существуют в нескольких стереоформах, которые на плоскости можно изобразить с помощью проекционных формул Фишера. Эпимерами называют сахара, различающиеся лишь конфигурацией при одном атоме углерода.
- Моносахариды часто образуют внутримолекулярные полуацетали или полукетали, в которых альдегидная или кетонная группа связана с гидроксильной группой той же молекулы, в результате чего возникает циклическая структура. Такие структуры изображают с помощью проекционных формул Хеуорса. Атом углерода, исходно принадлежавший альдегидной или кетонной группе (аномерный атом углерода), может находиться в одной из двух конфигураций (α или β), которые переходят друг в друга при мутаротации. В линейной форме моносахарида, находящейся в равновесии с циклической формой, аномерный атом углерода легко окисляется.
- Гидроксильная группа одного моносахарида может взаимодействовать с аномерным атомом углерода второго моносахарида с образованием ацетала. В подобном дисахариде гликозидная связь защищает аномерный атом от окисления.
- Олигосахариды — олигомеры, состоящие из небольшого числа моносахаридных звеньев, соединенных гликозидными связями. На одном конце цепи (восстанавливающем конце) сохраняется аномерный углерод, не участвующий в образовании гликозидной связи.

■ Номенклатура дисахаридов и олигосахаридов определяет порядок моносахаридных звеньев, конфигурацию каждого аномерного атома и номера атомов углерода, участвующих в образовании гликозидных связей.

7.2. Полисахариды

Большинство углеводов в природе представлено полисахаридами — полимерными молекулами с большой молекулярной массой. Полисахариды, или **гликаны**, различаются между собой природой моносахаридных звеньев, длиной цепи, типом гликозидных связей, а также степенью разветвленности. **Гомополисахариды** построены из одинаковых мономерных звеньев; **гетерополисахариды** могут содержать два или большее число разных мономеров (**рис. 7-13**). Некоторые гомополисахариды, такие как крахмал и гликоген, служат в качестве запасной формы (депо) моносахаридов и используются в качестве топливных молекул. Другие гомополисахариды (например, целлюлоза и хитин) выполняют функцию структурных элементов в

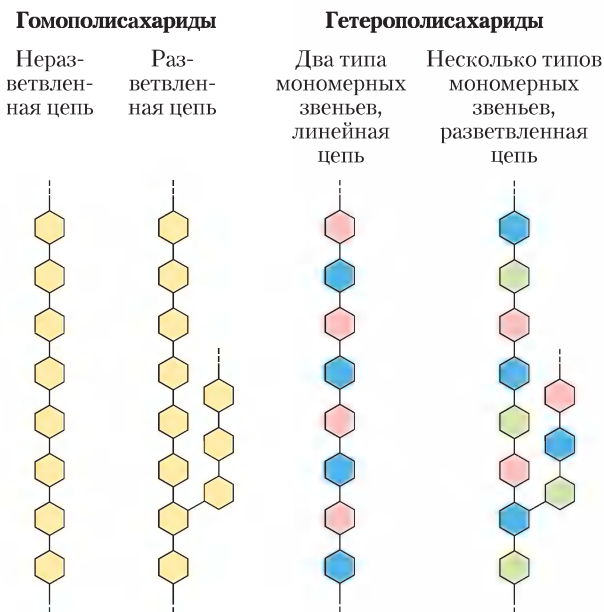


Рис. 7-13. Гомо- и гетерополисахариды. Полисахариды могут состоять из одного, двух или нескольких типов моносахаридных звеньев, соединенных в линейные или разветвленные цепи разной длины.

клеточных стенках растений и наружном скелете животных. Гетерополисахариды служат элементами внеклеточного каркаса у организмов всех царств. Например, прочный слой оболочки бактериальной клетки (пептидогликан) содержит в своем составе гетерополисахарид, построенный из двух чередующихся типов моносахаридных звеньев. В тканях животных внеклеточное пространство заполнено гетерополисахаридами различного типа, которые образуют каркас, удерживающий вместе индивидуальные клетки, а также обеспечивающий форму и защиту клеткам, тканям и органам.

В отличие от белков полисахариды обычно нельзя охарактеризовать строго определенной молекулярной массой, что объясняется различными механизмами сборки этих биополимеров. Как мы обсудим в гл. 27, белки синтезируются на матрице с определенной последовательностью и длиной (на информационной РНК) с помощью ферментов, синтез в точности следует «указаниям» матрицы. Для синтеза полисахаридов такой матрицы не существует; программа синтеза полисахарида заключена в самом ферменте, катализирующем полимеризацию мономерных звеньев, и в данном случае нет специфической команды для остановки процесса синтеза.

Некоторые гомополисахариды служат для запасания энергии клеткой

Наиболее важным запасным полисахаридом в клетках растений является крахмал, а в клетках животных — гликоген. Оба этих соединения находятся в клетках в виде крупных кластеров или гранул. Молекулы крахмала и гликогена сильно гидратированы, поскольку имеют множество обращенных наружу гидроксильных групп, доступных для образования водородных связей с водой. Крахмал образуется в большинстве клеток растений (см. рис. 20-2), но самая высокая его концентрация в клубнях (например, картофеля) и семенах.

Крахмал — это смесь двух полимеров глюкозы: амилозы и амилопектина (рис. 7-14). Амилоза состоит из длинных неразветвленных цепей, построенных из остатков D-глюкозы, соединенных ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-связями. Молекулярная масса таких цепей варьирует от нескольких тысяч до миллионов дальтон. Амилопектин так-

же имеет большую молекулярную массу (до 100 млн Да), но в отличие от амилозы его молекулы сильно разветвлены. В неразветвленных участках остатки глюкозы соединены между собой ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-гликозидными связями, а в участках ветвления (встречающихся через каждые 24–30 остатков) — ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-связями.

Гликоген — главный запасной полисахарид в животных клетках. Подобно амилопектину, гликоген представляет собой полимер, состоящий из соединенных ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-связями остатков глюкозы с разветвлениями, образованными ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-связями. Однако гликоген имеет гораздо более разветвленную (точки ветвления встречаются через каждые 8–12 остатков глюкозы) и более компактную структуру, чем крахмал. Больше всего гликогена содержится в печени, где на его долю приходится до 7% общей массы органа, кроме того, он встречается в скелетных мышцах. В гепатоцитах гликоген присутствует в виде крупных гранул, которые, в свою очередь, состоят из более мелких гранул, образованных единичными сильно разветвленными молекулами гликогена со средней молекулярной массой до нескольких миллионов дальтон. На этих гранулах прочно связаны ферменты, отвечающие за синтез и распад гликогена.

Поскольку каждая цепь гликогена оканчивается невосстанавливающим остатком сахара, в молекуле гликогена ровно столько невосстанавливающих концов, сколько ветвей содержится в его молекуле, но восстанавливающий конец только один. При использовании гликогена в качестве источника энергии остатки глюкозы отщепляются от невосстанавливающих концов по одному. Ферменты, катализирующие распад гликогена, действуют только на невосстанавливающие концы, но могут одновременно разрушать несколько ветвей, что значительно ускоряет процесс расщепления полимера на составляющие моносахариды.

Почему же глюкоза не хранится в клетке в виде мономера? Расчеты показали, что запас гликогена в гепатоците соответствует концентрации глюкозы 0,4 М. Реальная концентрация нерастворимого гликогена составляет 0,01 мкМ (это означает, что его вклад в осмолярность цитозоля очень мал). Если бы в цитозоле содержалось 0,4 М глюкозы, то осмолярность стала бы угрожающе высокой, что привело бы к проникновению

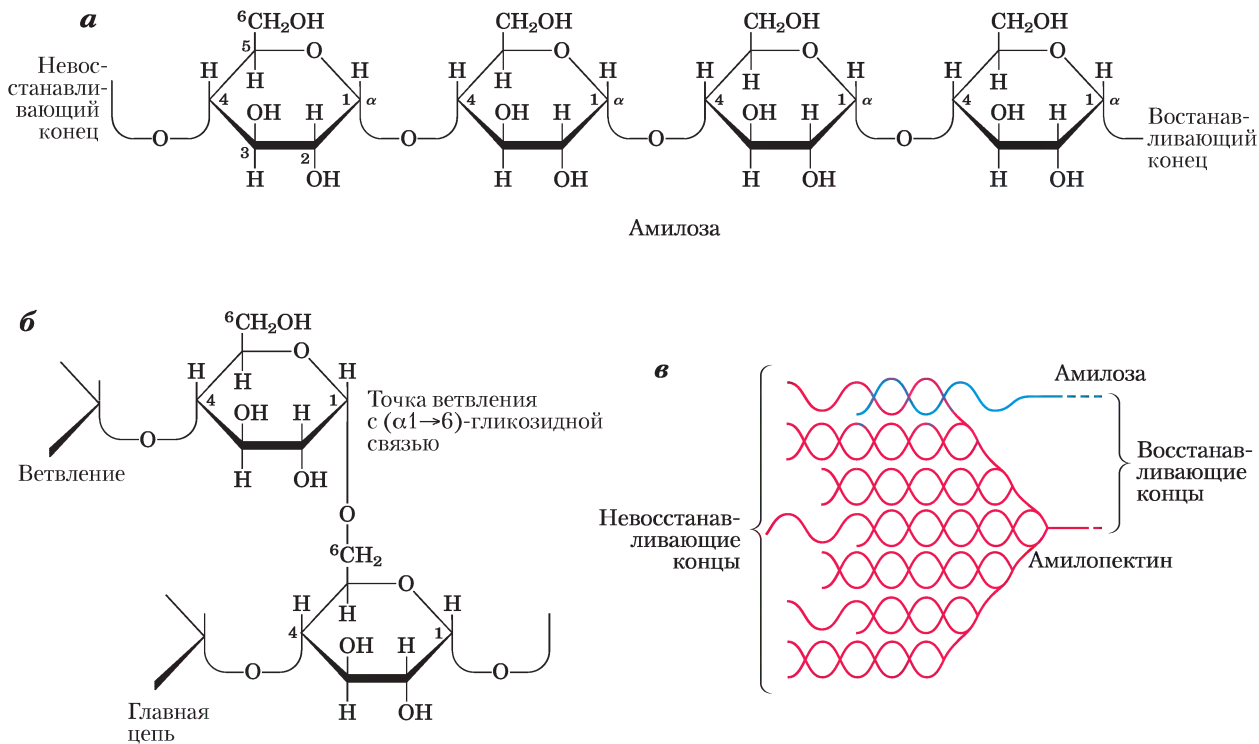


Рис. 7-14. Гликоген и крахмал. *а*) Короткий фрагмент амилозы — линейного полимера, состоящего из остатков D-глюкозы, соединенных ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-гликозидными связями. Единственная цепь амилозы содержит несколько тысяч остатков глюкозы. Амилопектин между точками ветвления имеет участки с таким же строением. У гликогена основная структура та же, но он более разветвленный, чем амилопектин. *б*) Точка ветвления в молекуле амилопектина, в которой мономерные звенья связаны ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-гликозидной связью. *в*) Фрагмент гранулы крахмала, состоящего из нитей амилозы и амилопектина. Нити амилопектина (изображены красным цветом) образуют друг с другом или с молекулами амилозы (изображена синим цветом) двойную спираль. В клетке при получении энергии из крахмала остатки глюкозы на невосстанавливающих концах внешних ветвей отщепляются ферментативным путем. Гликоген имеет сходное строение, но его молекулы более компактны и сильнее разветвлены.

в клетку воды и к лизису клетки (рис. 2-12). Более того, при внутриклеточной концентрации глюкозы 0,4 М и внеклеточной концентрации около 5 мМ (такова концентрация глюкозы в крови у млекопитающих) изменение свободной энергии процесса переноса глюкозы внутрь клетки против такого значительного градиента концентрации было бы недопустимо велико.

Декстраны — полисахариды бактерий и дрожжей, построенные из остатков D-глюкозы, соединенных ($\alpha 1 \rightarrow 6$)-связями. Все декстраны имеют точки ветвления, в которых остатки соединены ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-связями, а у некоторых дек-

странов, кроме того, встречаются разветвления с ($\alpha 1 \rightarrow 2$)- или ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-связями. Зубной камень, который образуют живущие на поверхности зубов бактерии, содержит большое количество декстранов. Синтетические декстраны используются в некоторых коммерческих продуктах, например в носителях для гель-фильтрации (в сефадексах) (рис. 3-17, б). Для этих целей декстраны подвергают химической обработке, после чего получают полимер с перекрестными сшивками — нерастворимый материал с разной степенью пористости, пригодный для разделения на нем макромолекул разного размера.

Некоторые гомополисахариды выполняют структурную функцию

Целлюлоза — прочное, волокнистое, нерастворимое в воде вещество; она содержится в клеточных стенках растений, главным образом в стеблях травянистых растений и стволах и ветвях деревьев. Целлюлоза является основным компонентом древесины, а хлопок состоит почти из чистой целлюлозы. Подобно амилозе и главным цепям амилопектина и гликогена, целлюлоза представляет собой линейный неразветвленный гомополисахарид, состоящий из 10 000–15 000 остатков D-глюкозы. Но есть важное отличие: в целлюло-



Рис. 7-16. Разрушение целлюлозы древесными грибами. Фотография древесного гриба, растущего на дубовом пне. Все древесные грибы содержат фермент целлюлазу, расщепляющую $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -гликозидные связи в молекуле целлюлозы, поэтому древесина может служить для этих грибов источником метаболизируемых сахаров (глюкозы). Среди позвоночных только крупный рогатый скот и другие жвачные (козы, овцы, верблюды, жирафы) могут использовать в пищу целлюлозу. В дополнительных отделах желудка этих животных (в рубце) обитают бактерии и простейшие, секретирующие целлюлазу.

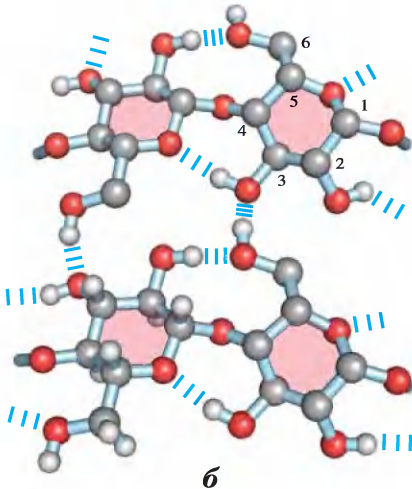
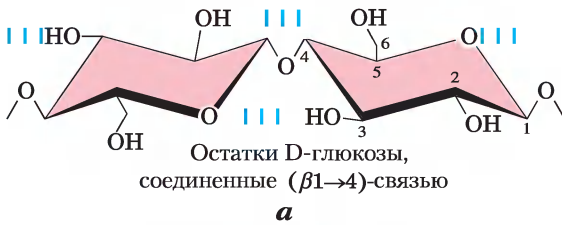


Рис. 7-15. Структура целлюлозы. а) Два мономерных звена целлюлозной цепи — остатки D-глюкозы, соединенные $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -связью. Звенья зафиксированы в конфигурации кресла, но могут поворачиваться друг относительно друга. б) Увеличенное изображение участков двух параллельных волокон целлюлозы; хорошо видны конформация остатков D-глюкозы и наличие перекрестных водородных связей. В левом нижнем остатке гексозы изображены все атомы водорода; в трех других остатках атомы водорода, соединенные с углеродом, не показаны, чтобы не загромождать рисунок, поскольку они не участвуют в образовании водородных связей.

зе гликозидные связи имеют β -конфигурацию (**рис. 7-15**), тогда как в амилозе, амилопектине и гликогене — α -конфигурацию. В целлюлозе остатки глюкозы связаны $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -связями, а в амилозе, крахмале и гликогене — $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ -связями. Это и объясняет весьма существенные различия в структуре и физических свойствах целлюлозы и амилозы.

Гликоген и крахмал, попадающие в организм с пищей, расщепляются α -амилазами слюны и желудочно-кишечного тракта; при этом рвутся $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ -гликозидные связи между остатками глюкозы. Что касается целлюлозы, то большинство животных не могут использовать ее в качестве пищи, поскольку в их организме нет фермента, расщепляющего $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -связи. Целлюлозу способны переваривать термиты, но эта их способность связана с тем, что в их желудочно-кишечном тракте обитает симбиотический микроорганизм *Trichonympha*, секретирующий целлюлазу, которая как раз и расщепляет $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -связи. Целлюлазу, кроме того, образуют некоторые грибы и бактерии, вызывающие гниение древесины (**рис. 7-16**).

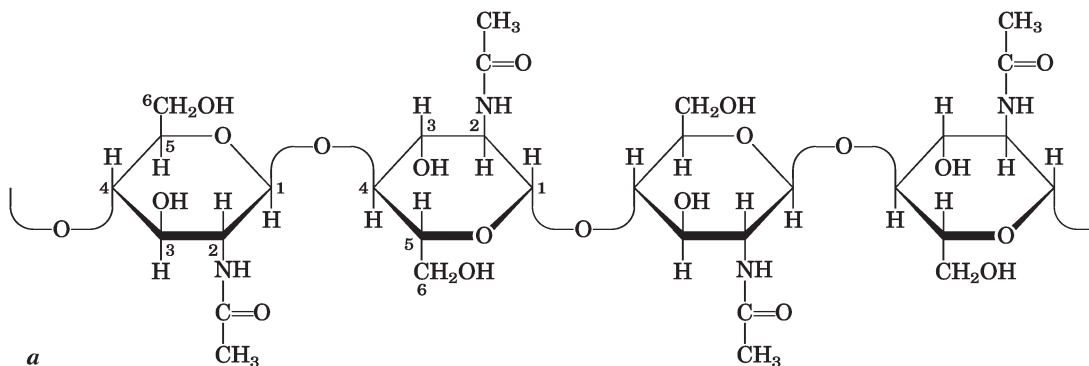


Рис. 7-17. Хитин. а) Короткий фрагмент молекулы хитина, состоящей из звеньев N-ацетил-D-глюкозамина, соединенных $(\beta 1 \rightarrow 4)$ -гликозидными связями. б) Жук *Pelidnota punctata* имеет прочный панцирь (внешний скелет) из хитина.

Хитин — линейный гомополисахарид, состоящий из остатков N-ацетилглюкозамина, соединенных β -гликозидными связями (рис. 7-17). Единственное его отличие от целлюлозы состоит в том, что вместо гидроксильных групп у атомов углерода C-2 у него находятся ацетилированные аминогруппы. Хитин образует длинные волокна, напоминающие волокна целлюлозы; подобно целлюлозе, хитин не переваривается позвоночными животными. Хитин составляет основу прочного наружного скелета у приблизительно миллиона видов членистоногих: насекомых, амаров, крабов и, возможно, является вторым по распространенности природным полисахаридом после целлюлозы; примерно 1 млрд т хитина производится в биосфере ежегодно!

На трехмерную структуру гомополисахаридов влияют стерические факторы и образование водородных связей

Трехмерная структура полисахаридов формируется по тем же принципам, что и пространственная структура полипептидных цепей. Мономерные звенья, строение которых строго определяется ковалентными связями, образуют трехмерные макромолекулярные структуры, которые стабилизируются слабыми взаимодействиями внутри молекулы или между соседними молекулами: водородными связями, гидрофобными, ван-дер-ваальсовыми, а в полимерах, имеющих заряженные мономерные звенья, и электростатическими взаимодействиями. Поскольку

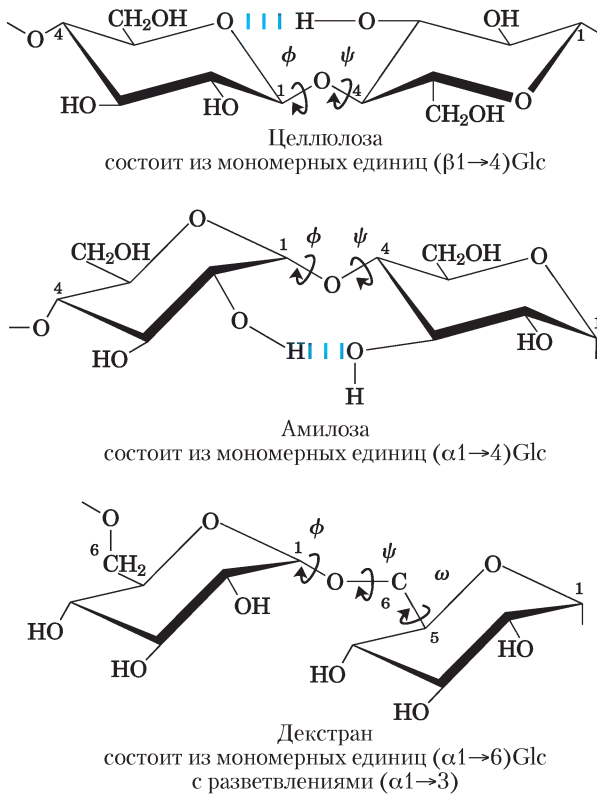
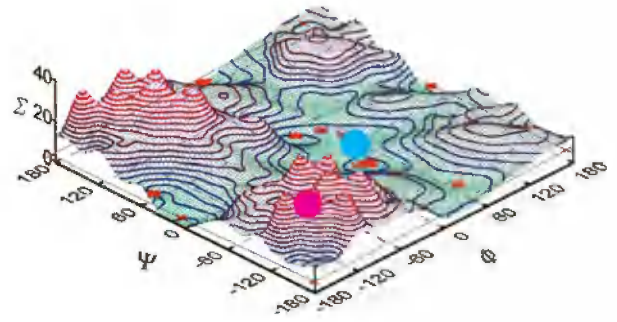


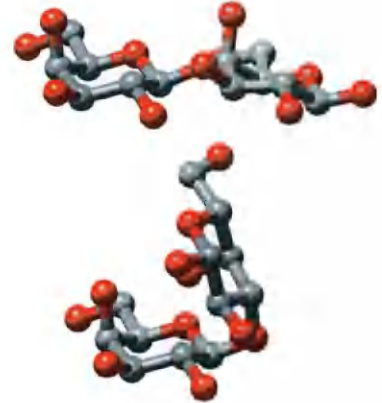
Рис. 7-18. Конформация гликозидных связей в целлюлозе, амилозе и декстране. Все эти вещества полимерной природы: жесткие пиранозные кольца соединены гликозидными связями, относительно которых возможно свободное вращение. Заметьте, что в молекуле декстрана, кроме того, возможно вращение вокруг связи, соединяющей атомы углерода С-5 и С-6 (торсионный угол ω (омега)).

полисахариды содержат множество гидроксильных групп, водородные связи оказывают особенно сильное влияние на их структуру. Гликоген, крахмал и целлюлоза, а также олигосахариды в составе гликопротеинов и гликолипидов, которые будут обсуждаться далее, построены из шестичленных циклических звеньев. Такие молекулы можно представить в виде цепей из жестких пиранозных колец, соединенных кислородным мостиком (гликозидной связью). Такая структура, в принципе, позволяет вращение относительно обеих С—О-связей между остатками (рис. 7-15, а). Однако, подобно тому, как это происходит в полипептидах (рис. 4-2, 4-8), вращение вокруг каждой связи ограничено стерическими факторами, которые определяются структурой заместителей. Трехмерная структура



а

● $\Phi, \Psi = 30^\circ, -40^\circ$



б

● $\Phi, \Psi = -170^\circ, -170^\circ$

Рис. 7-19. Карта разрешенных конформаций олигосахаридных и полисахаридных цепей. Торсионные углы ϕ и ψ (рис. 7-18), определяющие пространственное расположение соседних колец, могут принимать любые значения от 0 до 360° . Но при некоторых значениях углов соответствующие им конформации не могут существовать по пространственным соображениям, а другие значения, напротив, создают возможность для реализации максимального количества водородных связей. а) Если построить трехмерную энергетическую диаграмму Σ - ϕ - ψ и нанести на ней изоэнергетические контуры (линии, соответствующие одинаковым энергиям) с интервалами 1 ккал/моль, то можно определить, какие значения углов соответствуют предпочтительным конформациям. Эта карта аналогична карте Рамачандрана для пептидов (рис. 4-3, 4-8). б) Два состояния дисахарида Gal($\beta 1 \rightarrow 3$)Gal, соответствующие минимуму и максимуму энергии на диаграмме (а), на карте показаны красным и синим кружками. Красный кружок обозначает самую невыгодную конформацию, синий — самую выгодную. Конформационные состояния трех полисахаридов, изображенных на рис. 7-18, были определены методом рентгеноструктурного анализа: все они соответствуют областям с низким уровнем энергии.

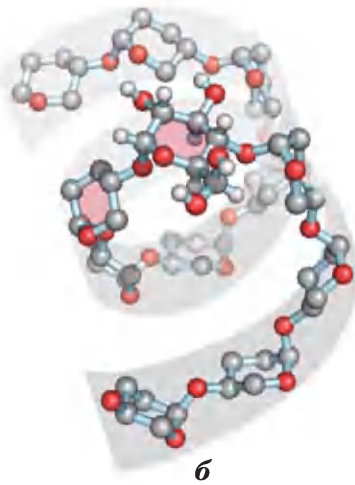
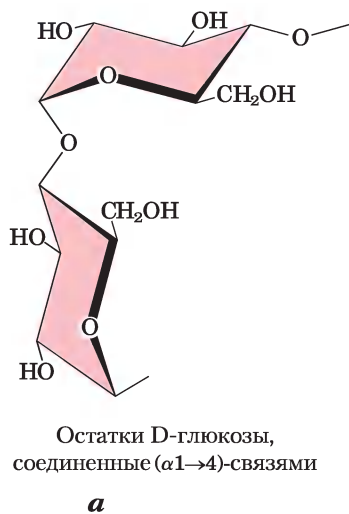


Рис. 7-20. Структура крахмала (амилозы). а) В наиболее устойчивом состоянии полимерная цепь амилозы, состоящая из остатков, жестко зафиксированных в конформации кресла, образует спираль, что отличает ее от целлюлозы, образующей длинные линейные волокна (рис. 7-16). б) Увеличенное изображение участка спирали амилозы. Благодаря наличию ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-связей амилоза, амилопектин и гликоген приобретают сильно спирализованную компактную структуру. Эта структура является основой плотных запасных гранул крахмала и гликогена во многих клетках (рис. 7-14).

этих молекул может быть описана торсионными (двугранными) углами ϕ и ψ при гликозидной связи (рис. 7-18), по аналогии с углами ϕ и ψ при пептидной связи (рис. 4-2).

Специфическая форма и большой размер пиранозного кольца и заместителей в кольце накладывают ограничения на величины углов ϕ и ψ ; некоторые конформации оказываются гораздо более устойчивыми, чем другие, что можно показать с помощью энергетической поверхности как функции ϕ и ψ (рис. 7-19).

Наиболее устойчивой трехмерной структурой ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-цепей крахмала и гликогена является спираль (рис. 7-20), которая стабилизируется водородными связями внутри цепи. В случае амилозы, не имеющей разветвлений, такая структура оказывается настолько упорядоченной, что были получены кристаллы этого вещества и исследованы методом рентгеновской дифракции. В среднем плоскость каждого остатка в цепи амилозы образует с плоскостью предыдущего остатка угол 60° , и в одном витке спирали содержится шесть остатков. Внутреннее пространство спирали амилозы по размеру точно подходит для размещения там комплексных иодид-ионов (I^{3-} или I^{5-}); реакция с иодом дает интенсивное синее окрашивание и используется в качестве стандартного количественного теста на амилозу.

В наиболее устойчивой форме целлюлозы каждый остаток глюкозы в конформации кресла повернут к соседнему на 180° , в результате

чего образуются длинные прямые нити. Все гидроксильные группы в целлюлозе доступны для образования водородных связей с соседними цепями. Сеть внутримолекулярных и межмолекулярных водородных связей между соседними нитями целлюлозы придает волокнам большую прочность (рис. 7-15, б). Это свойство целлюлозы человек использует уже тысячелетия. Из целлюлозы состоят папирус, бумага, картон, вискоза, изоляционная плитка и многие другие полезные материалы. Содержание воды в подобных материалах низкое, поскольку развитая сеть межмолекулярных водородных связей насыщает потребность молекул целлюлозы в образовании этих связей.

Клеточные стенки бактерий и водорослей содержат структурные гетерополисахариды

Каркас клеточных стенок бактерий (пептидогликан) образован гетерополимером из чередующихся звеньев N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связями (см. рис. 20-31). Линейные полимеры плотно уложены в клеточной стенке и удерживаются вместе короткими поперечными сшивками из разных пептидов, тип которых зависит от вида бактерии. Пептидные сшивки объединяют полисахаридные цепи в прочный каркас, обволакивающий всю клетку и препятствующий ее разбуханию и лизису в случае притока в клетку воды. Фермент лизоцим вызывает гибель бактерий, поскольку

гидролизует ($\beta 1 \rightarrow 4$)-гликозидные связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой (см. рис. 6-24). Лизоцим присутствует в слезной жидкости, где выполняет защитную функцию, препятствуя возникновению бактериальных инфекций. Некоторые вирусы бактерий образуют лизоцим, позволяющий им выходить из бактериальной клетки-хозяина (важная стадия цикла развития вируса). Пенициллин и родственные ему антибиотики уничтожают бактерии, поскольку препятствуют синтезу перекрестных шпиков каркаса, в результате чего клеточная стенка не может противостоять осмотическому лизису (см. с. 314–316).

Клеточные стенки некоторых красных морских водорослей содержат **агар** — смесь сульфатированных гетерополисахаридов, состоящих из D-галактозы и производного L-галактозы, в котором атомы углерода C-3 и C-6 соединены эфирной связью (рис. 7-21). Два основных компонента агара — это неразветвленный полимер **агароза** ($M_r \approx 120\,000$) и разветвленный полимер **агаропектин**. Замечательное свойство агарозы образовывать гели широко используется в биохимических лабораториях. Если суспензию агарозы в воде нагреть, а затем охладить, то ее молекулы образуют двойную спираль: две параллельно ориентированные молекулы закручиваются одна вокруг другой, причем виток спирали содержит три остатка сахара, а центральную полость занимают молекулы воды. Такие структуры, в свою оче-

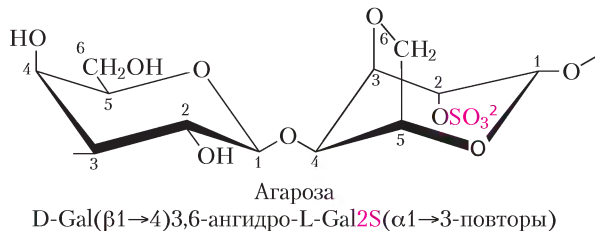


Рис. 7-21. Строение агарозы. Повторяющиеся единицы молекулы агарозы состоят из остатков D-галактозы, связанных ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связью с 3,6-ангидро-L-галактозой, в которой эфирная связь соединяет атомы углерода C-3 и C-6. Между собой эти структурные единицы соединены ($\alpha 1 \rightarrow 3$)-гликозидными связями, в результате чего образуется полимер из 600–700 остатков. Некоторые остатки 3,6-ангидрогалактозы этерифицированы серной кислотой у атома углерода C-2, как показано на рисунке.

редь, связываются друг с другом, образуя гель — трехмерную матрицу, удерживающую большое количество воды. Агарозные гели используются в качестве инертных носителей для электрофоретического разделения нуклеиновых кислот, в частности секвенирования ДНК (см. рис. 8-33). Агар применяют для изготовления твердых сред для выращивания колоний бактериальных клеток. Кроме того, из агара состоят оболочки капсул некоторых витаминов и лекарств; агар быстро растворяется в желудке и является метаболически инертным веществом.

Гликозаминогликаны — гетерополисахариды внеклеточного матрикса

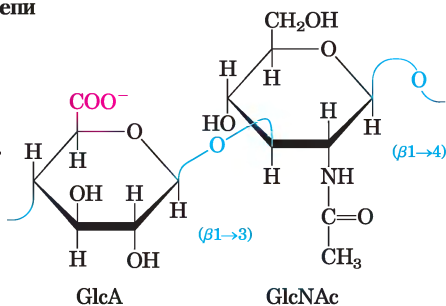
Межклеточное пространство в тканях многоклеточных животных заполнено гелеобразным веществом, называемым **внеклеточным матриксом** или основным веществом, которое удерживает клетки вместе и обеспечивает структуру пор для проникновения к отдельным клеткам питательных веществ и кислорода. Внеклеточный матрикс (ВКМ), окружающий фибробласты и другие клетки соединительной ткани, представляет собой сложную сеть из гетерополисахаридов и фибриллярных белков, таких как коллаген, эластин и фибронектин. Базальная мембрана — это особый тип внеклеточного матрикса, расположенного под эпителиальными клетками; она состоит из специализированного коллагена, ламинина и гетерополисахаридов. Эти гетерополисахариды образуют семейство линейных полимеров **гликозаминогликанов**, построенных из повторяющихся дисахаридных звеньев (рис. 7-22). Гликозаминогликаны есть у животных и у бактерий, а в растениях они не обнаружены.

Один из двух моносахаридов — всегда либо N-ацетилглюкозамин, либо N-ацетилгалактозамин; вторым моносахаридом обычно является уроновая кислота, чаще всего D-глюкуроновая или L-идуриновая кислота. Некоторые гликозаминогликаны содержат этерифицированные сульфатные группы. Сочетание сульфатных и карбоксильных групп в остатках уроновых кислот создает на молекулах гликозаминогликанов высокую плотность отрицательных зарядов. Чтобы минимизировать отталкивание между соседними группами, молекулы в растворе принимают развернутую конформацию,

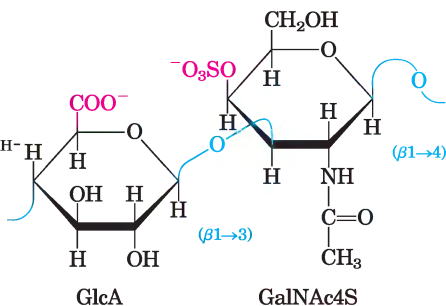
Гликозаминогликан **Повторяющееся дисахаридное звено**

Число дисахаридных звеньев в цепи

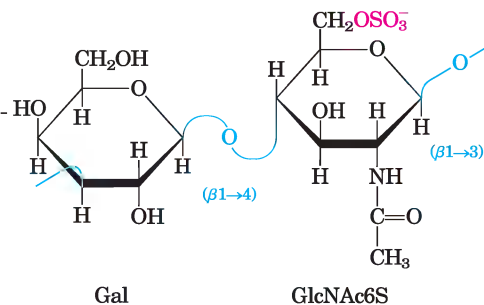
Гиалуронат
~50 000



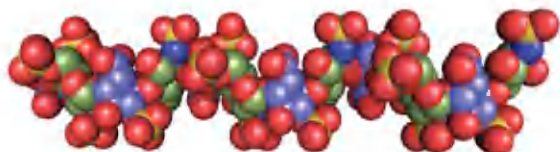
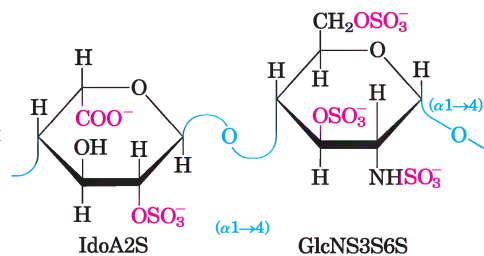
Хондроитин-4-сульфат
20–60



Кератан-4-сульфат
~25



Гепарин
15–90



Сегмент гепарина

Рис. 7-22. Мономерные звенья некоторых гликозаминогликанов внеклеточного матрикса. Гликозаминогликаны (за исключением кератансульфата) представляют собой сополимеры, построенные из чередующихся остатков урюновых кислот и аминсахаров, которые могут быть сульфатированы по любому атому (кроме гиалуроновой кислоты). При ионизации карбоксильных и сульфатных групп (выделены красным цветом) на полимере создаются отрицательные заряды. Лекарственная форма гепарина в основном содержит идуроновую кислоту (IdoA) и небольшое количество глюкуроновой кислоты (GlcA; не показана); молекулы гепарина обычно сильно сульфатированы и гетерогенны по размеру. Пространственная модель, изображающая участок гепарина в том состоянии, в котором он находится в растворе (по данным ЯМР-спектроскопии; PDB ID 1HPN). Атомы углерода идуроновой кислоты изображены синими, а атомы углерода глюкозамина — зелеными. Атомы кислорода и серы, как всегда, изображены соответственно красными и желтыми. Для простоты атомы водорода не показаны. Гепарансульфат (не показан) похож на гепарин, но имеет более высокое содержание GlcA и меньше сульфатных групп, которые распределены менее регулярным образом.

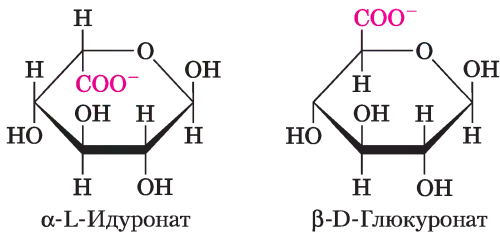
образуя вытянутую спираль с расположенными на концах отрицательно заряженными карбоксильными группами (как показано для гепарина на рис. 7-22). Вытянутая форма также дает возможность максимально развести в пространстве отрицательно заряженные сульфатные группы. Специфическое распределение сульфатированных и несulfатированных остатков сахаров в гликозаминогликанах позволяет осуществлять связывание определенных белковых лигандов электростатическими силами. Гликозаминогликаны связываются с внеклеточными белками и образуют протеогликаны (разд. 7.3).

Гликозаминогликан **гиалуроновая кислота** (при физиологических значениях pH находится в форме гиалуроната) состоит из чередующихся звеньев D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-глюкозамина (рис. 7-22). Гиалуронаты могут содержать до 50 000 дисахаридных звеньев и имеют молекулярную массу свыше 1 млн Да.

Эти вещества образуют прозрачные и очень вязкие среды и входят в состав синовиальной жидкости суставов в качестве смазки, а также в состав стекловидного тела глаза позвоночных, придавая ему желеобразную консистенцию (от греч. *hyalos* — стекло; растворы гиалуронатов

имеют прозрачный или полупрозрачный вид). Гиалуронаты, кроме того, являются важной составляющей внеклеточного матрикса хрящей и сухожилий, которым они придают прочность и эластичность, поскольку взаимодействуют с другими компонентами матрикса. Некоторые патогенные бактерии секретируют фермент гиалуронидазу, способную расщеплять гликозидные связи гиалуроната, что делает ткани более уязвимыми для бактериальной инфекции. У многих организмов похожий фермент содержится в сперматозоидах, он гидролизует внешнюю гликозаминогликановую оболочку яйцеклеток и позволяет сперматозоидам проникнуть внутрь.

Другие гликозаминогликаны отличаются от гиалуронатов по трем признакам: во-первых, их размеры гораздо меньше; во-вторых, они связаны ковалентной связью со специфическими белками, образуя протеогликаны; в-третьих, один или оба их мономера отличаются от мономеров гиалуроната. Хондроитинсульфат (от греч. *chondros* — хрящ) придает прочность хрящам, сухожилиям, связкам и стенкам аорты. Дерматансульфат (от греч. *derma* — кожа) определяет эластичность кожи, а также кровеносных сосудов и клапанов сердца. В этом полимере многие остатки глюкоуроната (GlcA), присутствующие в хондроитине, заменены 5-эпимером — L-идуронатом (IdoA).



Кератансульфаты (от греч. *keras* — рог) не содержат урановой кислоты, а количество сульфатированных групп в них колеблется. Они обнаружены в роговице глаза, хрящах, костях, а также многих ороговевших структурах, образованных отмершими клетками: рогах, волосах, копытах, ногтях и когтях. **Гепарансульфат** (от греч. *hepar* — печень) синтезируется всеми животными клетками и содержит сульфатированные и несulfатированные сахара в различном сочетании. Сульфатированные участки цепи позволяют гепарину взаимодействовать с разными белками, включая факторы роста и компоненты ВКМ, а также с ферментами и факторами, при-

сутствующими в плазме крови. Гепарин — фракционированная (низкомолекулярная) форма гепарансульфата, которую выделяют в основном из тучных клеток (тип лейкоцитов). Лекарственный препарат гепарин используется в медицине для предотвращения свертывания крови благодаря своей способности связываться с ингибитором протеиназ антитромбином. Связанный с гепарином антитромбин ингибирует тромбин — протеазу, играющую важную роль в свертывании крови. Взаимодействие гепарина с антитромбином имеет электростатическую природу; молекула гепарина несет высокий отрицательный заряд, плотность которого выше, чем у всех других известных биологических молекул (рис. 7-23). Очищенный гепарин добавляют в образцы крови при проведении клинических анализов, а также в донорскую кровь для предотвращения свертывания.

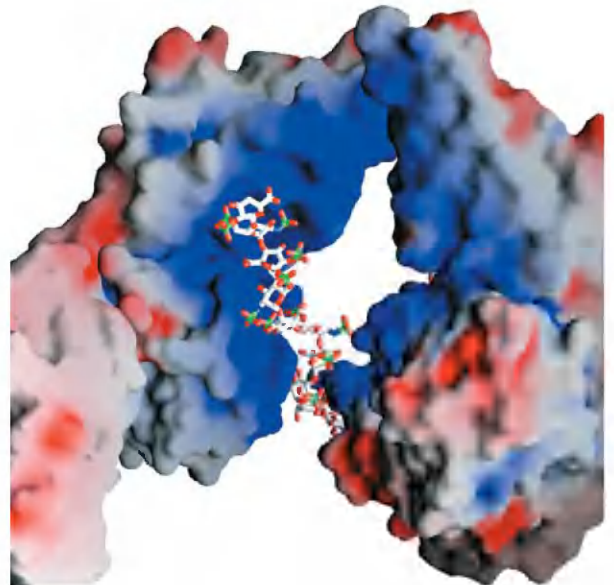


Рис. 7-23. Взаимодействие между гликозаминогликаном и белком. Показана структура образца, полученного путем сокристаллизации фактора роста фибробластов (ФРФ1), его клеточного рецептора и короткого фрагмента гликозаминогликана (гепарина) (PDB ID 1E00). Распределение заряда на поверхности белка показано цветом: красный — преимущественно отрицательный заряд, синий — преимущественно положительный заряд. Гепарин изображен в виде шаростержневой модели; отрицательно заряженные группы гепарина ($-\text{SO}_3^-$ и $-\text{COO}^-$) связаны с положительно заряженной (синей) областью молекулы белка. Здесь показан гепарин, но в реакциях *in vivo* с ФРФ участвует гепарансульфат.

Таблица 7-2 Состав и биологическая роль некоторых полисахаридов

Биополимер	Тип*	Мономерное звено**	Размер (число моносахаридных звеньев)	Биологическая роль
Крахмал Амилоза Амилопектин	Гомо- Гомо-	($\alpha 1 \rightarrow 4$)Glc, линейный ($\alpha 1 \rightarrow 4$)Glc с ($\alpha 1 \rightarrow 6$)Glc разветвлениями через каждые 24–30 остатков	50–5000 До 10^6	Запас энергии в клетках растений
Гликоген	Гомо-	($\alpha 1 \rightarrow 4$)Glc с ($\alpha 1 \rightarrow 6$)Glc разветвлениями через каждые 8–12 остатков	До 50 000	Запас энергии в бактериальных и животных клетках
Целлюлоза	Гомо-	($\beta 1 \rightarrow 4$)Glc	До 15 000	Структурная: придает жесткость и прочность клеточным стенкам растений
Хитин	Гомо-	($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc	Очень большой	Структурная: обеспечивает прочность внешнего скелета насекомых, паукообразных и ракообразных
Декстран	Гомо-	($\alpha 1 \rightarrow 6$)Glc с разветвлениями ($\alpha 1 \rightarrow 3$)	Изменяется в широком диапазоне	Структурная: адгезия бактериальных клеток
Пептидогликан	Гетеро-; связан с пептидами	Mur2Ac($\beta 1 \rightarrow 4$)GlcNAc	Очень большой	Структурная: придает жесткость и прочность оболочке бактериальной клетки
Агароза	Гетеро-	D-Gal($\beta 1 \rightarrow 4$)3,6-ангидро-L-Gal($\alpha 1 \rightarrow 3$)	1000	Структурная: входит в состав клеточной стенки водорослей
Гиалуронат (гликоз-аминогликан)	Гетеро-; кислотные свойства	Glc($\beta 1 \rightarrow 3$)GlcNAc($\beta 1 \rightarrow 4$)	До 100 000	Структурная: внеклеточный матрикс кожи и соединительных тканей, смазка суставов позвоночных

* Биополимер может содержать одинаковые (гомополисахарид) или разные остатки (гетерополисахарид).

** Сокращенные названия структурной единицы пептидогликана, агарозы и гиалуроната указывают на то, что их полимеры состоят из дисахаридов. Например, в пептидогликане остаток GlcNAc одного дисахарида связан ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связью с первым остатком следующего дисахарида.

В табл. 7-2 суммированы данные по составу, свойствам и биологической роли полисахаридов, описанных в разд. 7.2.

Краткое содержание раздела 7.2 ПОЛИСАХАРИДЫ

■ Полисахариды (гликаны) служат для хранения энергии и в качестве структурных компонентов клеточной стенки и внеклеточного матрикса.

■ Гомополисахариды крахмал и гликоген запасают энергию в клетках растений, животных и бактерий. Они состоят из остатков D-глюкозы, соединенных ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связями, и имеют разветвленное строение.

■ Гомополисахариды целлюлоза, хитин и декстран выполняют структурные функции. Целлюлоза, построенная из остатков D-глюкозы, соединенных ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связями, придает прочность и жесткость клеточным стенкам растений. Хитин, состоящий из остатков N-ацетилглюкозамина, соединенных ($\beta 1 \rightarrow 4$)-связями,

служит основой внешнего скелета членистоногих. Декстран формирует капсулу вокруг некоторых бактериальных клеток.

- Гомополисахариды имеют трехмерную структуру. Конформация кресла, в которой существует пиранозное кольцо, является очень жесткой, так что структура этих биополимеров определяется возможностью вращения вокруг связей кислорода с аномерными атомами углерода. Крахмал и гликоген образуют спиральную структуру, которая удерживается большим числом водородных связей. Целлюлоза и хитин образуют протяженные линейные нити, взаимодействующие посредством водородных связей с соседними нитями.
- Прочность клеточных стенок бактерий и водорослей объясняется наличием там гетерополисахаридов: пептидогликанов у бактерий и агара у красных водорослей. Повторяющееся дисахаридное звено в пептидогликане — $\text{Mur2Ac}(\beta 1 \rightarrow 4)\text{GlcNAc}$, в агарозе — $\text{D-Gal}(\beta 1 \rightarrow 4)3,6\text{-ангидро-L-Gal}$.
- Гликозаминогликаны — это внеклеточные гетерополисахариды, в которых одной из двух моносахаридных единиц является уроновая кислота, а второй — N-ацетилированный аминокислота. Часть гидроксильных групп и аминогруппы некоторых остатков глюкозамина этих полимеров сульфатированы, что придает им большой отрицательный заряд и заставляет принимать развернутую конформацию. Полимеры (гиалуронат, хондроитинсульфат, дерматансульфат, кератансульфат и гепарин) обеспечивают вязкость, адгезивность и прочность внеклеточного матрикса.

7.3. Гликоконъюгаты: протеогликаны, гликопротеины и гликолипиды

Олиго- и полисахариды играют важную роль не только в сохранении энергии в клетке (крахмал, гликоген) и выполняют структурные функции (целлюлоза, хитин, пептидогликаны), но и участвуют в передаче информации. Некоторые сахара являются медиаторами специфических взаимодействий клеток между собой и с внекле-

точным матриксом; другие играют роль меток, указывающих направление транспорта, место локализации определенных органелл или необходимость разрушения неправильно упакованных или находящихся в избытке белков. Кроме того, они могут служить сайтами узнавания для внеклеточных сигнальных молекул (например, ростовых факторов) или внеклеточных паразитов (бактерий или вирусов). На поверхности почти каждой эукариотической клетки находятся специфические цепочки олигосахаридов, прикрепленные снаружи к плазматической мембране; они образуют углеводный слой (*гликокаликс*) толщиной в несколько нанометров. Этот слой несет множество информации о клетке для ее окружения. Такие олигосахариды играют главную роль в процессах клеточного узнавания, адгезии и перемещения клеток в период их созревания, в свертывании крови, иммунном ответе, заживлении ран и многих-многих других процессах. В большинстве случаев информационные углеводы связаны ковалентной связью с белками или липидами, образуя биологически активные **гликоконъюгаты**.

Протеогликаны — это макромолекулы, находящиеся на поверхности клеток или во внеклеточном матриксе, в которых одна или несколько цепей гликозаминогликанов связаны ковалентной связью с мембранным или секретлируемым белком. Цепь гликозаминогликана может прикрепляться к внеклеточным белкам благодаря электростатическим взаимодействиям с отрицательно заряженными группами полисахарида. Протеогликаны — основной компонент внеклеточного вещества.

Гликопротеины — это белки с ковалентно присоединенными к ним одним или несколькими олигосахаридами разной сложности. Эти вещества обычно обнаруживаются на внешней поверхности плазматической мембраны, во внеклеточном матриксе и в крови. Внутри клеток они встречаются в таких органеллах, как аппарат Гольджи, секреторные гранулы и лизосомы. Олигосахариды в составе молекул гликопротеинов более разнообразны, чем гликозаминогликаны в протеогликанах. Олигосахариды гликопротеинов несут в себе много информации, образуют высокоспецифичные сайты узнавания и высокоаффинные центры связывания в углеводсвязывающих белках, которые называют лектинами. Некоторые белки ядра и цитоплазмы тоже могут быть гликозилированы.

Гликолипиды — мембранные сфинголипиды, гидрофильная «головка» которых образована олигосахаридами, служащими, как и в случае гликопротеинов, в качестве специфических участков узнавания лектинов. Гликолипидов много в мозге и нервной ткани, где они участвуют в проведении нервного импульса и образовании миелиновой оболочки. Кроме того, гликолипиды задействованы в передаче клеточных сигналов.

Протеогликаны — макромолекулы клеточной поверхности и внеклеточного матрикса, содержащие гликозаминогликаны

Клетки млекопитающих синтезируют около 40 типов протеогликанов. Эти молекулы влияют на многие процессы в клетке, такие как активация факторов роста и адгезия. Типичный протеогликан — коровый белок (от англ. *core* — ядро, центр), к которому ковалентной связью прикреплен(ы) гликозаминогликан(ы). Прикрепление к белку обычно происходит у остатка серина и осуществляется с помощью трисахаридного мостика (рис. 7-24). Как правило, остаток Ser, через который осуществляется связывание, встречается в последовательности $-\text{Ser}-\text{Gly}-\text{X}-\text{Gly}-$ (где X — любой аминокислотный остаток), однако не каждый белок с такой последовательностью связан с гликозаминогликаном. Многие протеогликаны секретируются во внеклеточный матрикс,

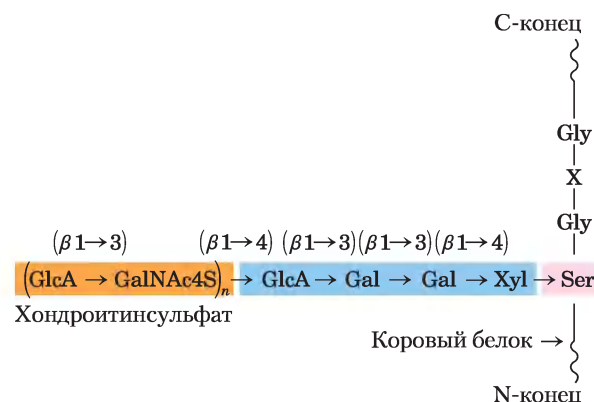


Рис. 7-24. Строение протеогликанов. Типичный трисахарид (выделен голубым цветом) соединяет гликозаминогликан (в данном случае хондроитинсульфат, выделен оранжевым цветом) с остатком серина (розовый) в коровом белке. Остаток ксилозы на восстанавливающем конце этой линкерной последовательности своим аномерным атомом присоединен к гидроксильной группе остатка Ser.

но некоторые представляют собой интегральные мембранные белки (рис. 11-6). Например, во внеклеточном матриксе между организованными группами клеток содержится целое семейство коровых белков с молекулярными массами от 20 000 до 40 000, каждый из этих белков связан ковалентными связями с несколькими цепями гепарансульфата. Существуют два семейства мембранных протеогликанов гепарансульфата. У **синдекана** один трансмембранный домен, а также внеклеточный домен, связанный с тремя цепями гепарансульфата и двумя цепями хондроитинсульфата (рис. 7-25, а). Глипиканы прикреплены к мембране с помощью якоря, образованного производным мембранного липида фосфатидилинозита (гл. 11). И синдеканы, и глипиканы могут высвобождаться в межклеточное пространство. Протеаза внеклеточного матрикса отрезает цепь биополимера вблизи поверхности мембраны, высвобождая эктодомены синдекана (домены, выступающие снаружи плазматической мембраны), а фосфорилаза разрушает связь с мембранными липидами, высвобождая глипиканы. Существуют также многочисленные протеогликаны хондроитинсульфата и дерматансульфата, некоторые из них связаны с мембраной, другие секретируются в межклеточное пространство.

Цепи гликозаминогликана могут связываться с различными внеклеточными лигандами и тем самым модулировать взаимодействие лиганда со специфическим рецептором на поверхности клетки. Детальное изучение гепарансульфата выявило гетерогенность его структуры: некоторые участки (обычно длиной 3–8 дисахаридных звеньев) могут отличаться от соседних последовательностей и способностью связывать определенные белки. Сильно сульфатированные домены (NS-домены) чередуются с N-ацетилированными, или NA-доменами, содержащими немодифицированные остатки N-ацетилглюкозамина GlcNAc и глюкоуроновой кислоты GlcA (рис. 7-25, б). Характер сульфатирования NS-домена зависит от самого протеогликана; если учесть возможное число модификаций димера GlcNAc–IdoA, то получается, что могут существовать по меньшей мере 32 варианта дисахаридного звена. Более того, некоторые коровые белки, синтезирующиеся в различных типах клеток, могут иметь разную структуру гепарансульфата.

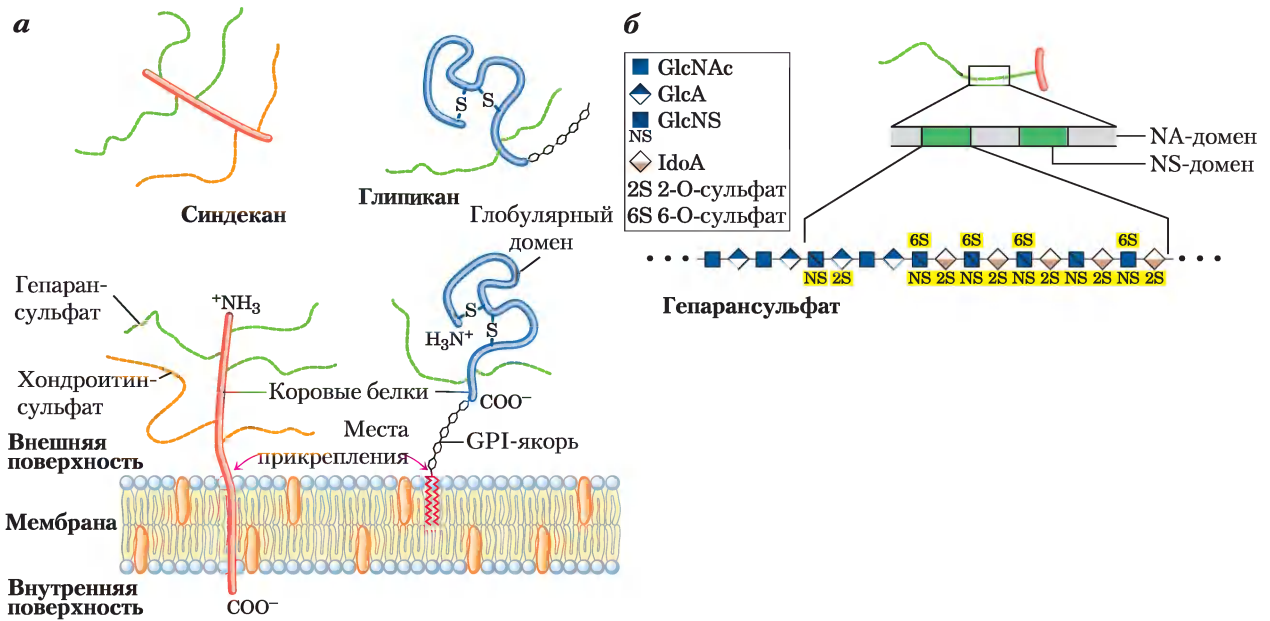
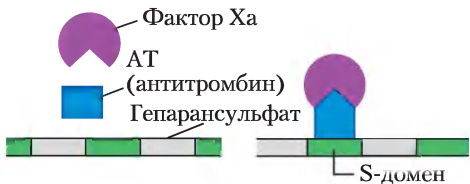


Рис. 7-25. Строение протеогликанов интегрального мембранного белка. а) Синдекан и глипикан в плазматической мембране. Синдекан удерживается в мембране гидрофобными взаимодействиями своих неполярных боковых групп аминокислот с липидами плазматической мембраны и может высвобождаться (отрезаться) с поверхности протеазами. В случае синдекана его N-концевой участок торчит на поверхности мембраны и ковалентно присоединяет через трисахаридный линкер три цепи гепарансульфата и две цепи хондроитинсульфата (рис. 7-24). Глипикан удерживается в мембране ковалентными связями с мембранными липидами (GPI-якорь, см. гл. 11) и может высвобождаться при расщеплении связи белок–липид фосфолипазой. Все глипиканы содержат по 14 остатков Cys, которые образуют дисульфидные мостики для стабилизации белковой части, и две-три цепи гликозаминогликанов, прикрепленных к поверхности мембраны С-концом. б) В гепарансульфатах участки с высоким содержанием сульфатированных остатков (S-домены, изображены зеленым цветом) чередуются с участками немодифицированных остатков GlcNAc и GlcA (NA-домены, на рисунке серые). Справа показано строение S-домена с высокой плотностью модифицированных остатков: GlcA сульфатирован у атома C-6, IdoA – у атома C-2. Точное расположение сульфатированных остатков зависит от типа протеогликана.

NS-домены специфическим образом связывают внеклеточные белки и сигнальные молекулы, изменяя их активность. Активность может меняться из-за конформационных изменений в молекуле белка, вызванных связыванием (рис. 7-26, а), либо из-за того, что соседние гепарансульфатные домены связываются с другими белками, это приводит к их сближению и усилению белок-белковых взаимодействий (рис. 7-26, б). Третьим общим механизмом является связывание внеклеточных сигнальных молекул (например, факторов роста) с гепарансульфатом, что повышает их локальную концентрацию и усиливает взаимодействие с

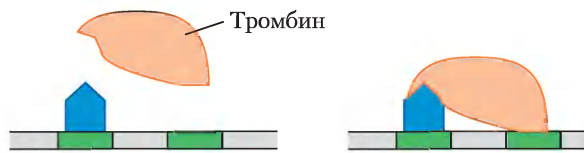
соответствующими рецепторами на клеточной поверхности. В таком случае гепарансульфат выступает в роли корецептора (рис. 7-26, в). Например, фактор роста фибробластов (ФРФ) – внеклеточный сигнальный белок, стимулирующий деление клетки, сначала связывается с гепарансульфатом в молекуле синдекана, находящейся в плазматической мембране клетки. Синдекан передает ФРФ его рецептору на плазматической мембране, и лишь после этого ФРФ может продуктивно взаимодействовать со своим рецептором и стимулировать деление клетки. И наконец, NS-домен под действием электростатических или других сил взаимодействует с

а
Активация в результате конформационной перестройки



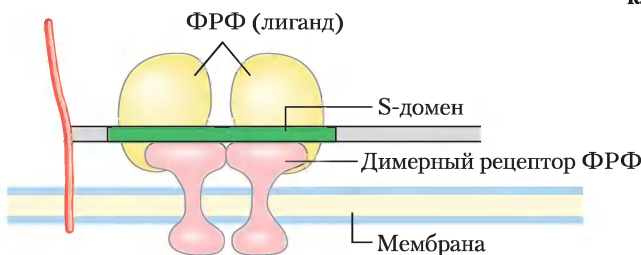
Конформационное изменение, происходящее в антитромбине (АТ) при связывании специфического пентасахаридного S-домена, позволяет ему взаимодействовать с фактором свертывания крови Ха, что предотвращает свертывание.

б
Усиление белок-белковых взаимодействий



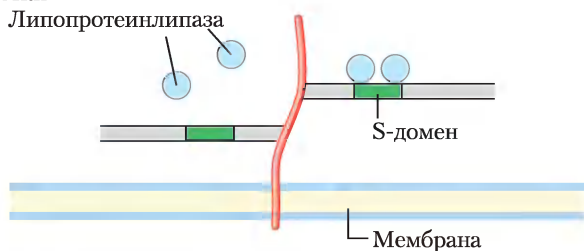
Связывание АТ и тромбина в двух соседних S-доменах приводит к их сближению и взаимодействию, что предотвращает свертывание крови.

в
Корецептор для внеклеточных лигандов



S-Домены взаимодействуют как с фактором роста фибробластов (ФРФ), так и с его рецептором, в результате чего образуется олигомерный комплекс и повышается эффективность действия низкой концентрации ФРФ.

г
Локализация (концентрирование) на поверхности клетки



Высокая плотность отрицательных зарядов в молекуле гепарансульфата притягивает положительно заряженные молекулы липопротеинлипазы и удерживает их как за счет электростатических взаимодействий, так и за счет специфической связи с S-доменами. Такие взаимодействия играют важную роль и на первом этапе проникновения в клетку некоторых вирусов (таких как вирусы простого герпеса HSV-1 и HSV-2).

Рис. 7-26. Четыре типа взаимодействий NS-домена гепарансульфата с белками.

различными растворимыми молекулами, находящимися вне клетки, и таким образом поддерживает их высокую локальную концентрацию вблизи клеточной поверхности (рис. 7-26, г). Большое значение правильной локализации сульфатированных доменов гепарансульфата было продемонстрировано в эксперименте с нокаутными мышами, которые лишены фермента, сульфатирующего гидроксильную группу у атома углерода C-2 в остатке IdoA. У таких животных отсутствовали почки и наблюдались очень серьезные врожденные аномалии развития скелета и глаз. В других исследованиях была показана важная роль мембранных протеогликанов в клиренсе липопротеинов в печени. Получены доказательства, что на траекторию роста аксона

и, следовательно, на нервную проводимость влияют протеогликаны (гепарансульфат и хондроитинсульфат), которые подают направляющие сигналы для разрастания аксонов.

Некоторые протеогликаны способны образовывать **агрегаты** — огромные надмолекулярные комплексы, состоящие из множества коровых белков, связанных с одной-единственной молекулой гиалуроната. К остаткам серина в коровом белке агрекана ($M_r \approx 250\,000$) через трисахаридные мостики присоединяется множество цепей хондроитинсульфата и кератансульфата, образуется мономер агрекана с молекулярной массой около $2 \cdot 10^6$. Когда сотни подобным образом «украшенных» коровых белков связываются с одной протяженной молекулой гиалуроната

(рис. 7-27), образующийся протеогликановый агрегат с молекулярной массой более $2 \cdot 10^8$ Да и связанная с ним гидратная оболочка занимают объем, приблизительно равный объему целой бактериальной клетки! Агрегат прочно связывается с коллагеном внеклеточного матрикса хряща, что важно для развития и обеспечения прочности этой соединительной ткани.

Огромные внеклеточные протеогликаны перевиты фибриллярными белками матрикса, такими как коллаген, эластин и фибронектин, что в результате приводит к образованию обширной сети, обеспечивающей прочность и эластичность внеклеточного матрикса. У некоторых из этих белков есть центры связывания для нескольких молекул матрикса. Например, фибронектин содержит участки для связывания фибрина, гепарансульфата, коллагена и белков

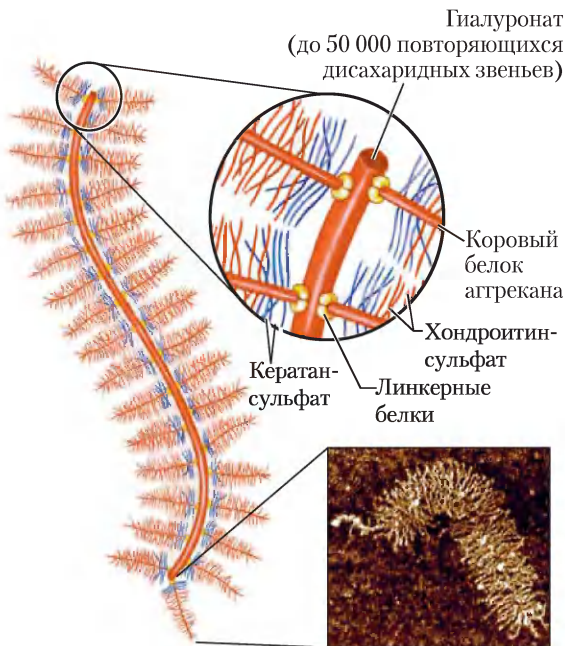


Рис. 7-27. Агрегаты протеогликанов во внеклеточном матриксе. Протеогликан с множеством молекул агрекана. Одна очень длинная молекула гиалуроната связана нековалентными связями примерно с сотней молекул корового белка агрекана. Каждая молекула агрекана содержит несколько ковалентно связанных цепей хондроитинсульфата и кератансульфата. Взаимодействие этого корового белка с гиалуронатом осуществляется через линкерные белки, расположенные в каждой точке соединения цепи гиалуроната и корового белка. На фотографии представлена молекула агрекана в атомно-силовом микроскопе (см. доп. 11-1).

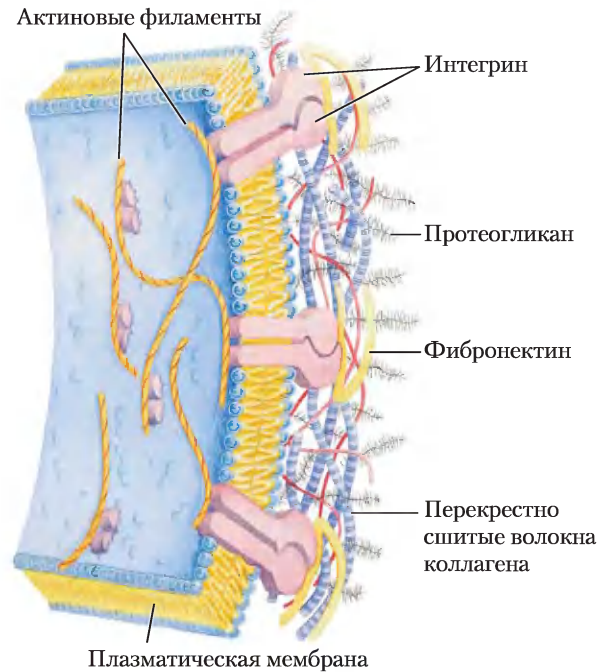


Рис. 7-28. Взаимодействие клетки с внеклеточным матриксом. Связь клеток с протеогликанами внеклеточного матрикса происходит с помощью мембранного белка интегрина и внеклеточного белка (например, фибронектина), который содержит центры связывания как для интегрина, так и для протеогликана. Обратите внимание на тесный контакт нитей коллагена с фибронектином и протеогликаном.

плазматической мембраны из семейства интегринов, роль которых заключается в проведении сигнала от клетки к внеклеточному матриксу (см. рис. 12-28). Общая картина взаимодействий между клеткой и матриксом (рис. 7-28) характеризуется комплексом связей между клеточными и внеклеточными молекулами. Эти взаимодействия важны не только для удерживания клетки в матриксе, но и для обеспечения путей передвижения клеток в развивающихся тканях и переноса информации (посредством интегринов) в клетку и из нее через плазматическую мембрану.

Гликопротеины содержат ковалентно связанные олигосахариды

Гликопротеины — конъюгаты белков и углеводов, в которых углеводные цепи короче и разнообразнее, чем цепи гликозаминогликанов в составе протеогликанов. Углеводы присоединены

через свой аномерный атом углерода к ОН-группе Ser или Thr (О-гликозидная связь) или с амидным азотом остатка Asn (N-гликозидная связь) (рис. 7-29). Некоторые гликопротеины содержат лишь одну олигосахаридную цепь, но многие несколько. Углеводная часть может составлять от 1 до 70% массы гликопротеина. **Муцины** — это секретируемые или мембранные гликопротеины, которые могут содержать большое количество олигосахаридных цепей, связанных О-гликозидными связями. Муцины присутствуют в большинстве секретов; именно они придают слизи характерную скользкость. Около половины всех белков млекопитающих гликозилированы, а около 1% генов млекопитающих кодируют ферменты, участвующие в синтезе и прикреплении этих олигосахаридных цепей. Последовательности, присоединяемые О-гликозидными связями, обычно содержат мно-

го остатков Gly, Val и Pro. Напротив, прикрепление N-гликозидных связей зависит от наличия консенсусной последовательности N-{P}-[ST] (способы изображения консенсусных последовательностей обсуждались в доп. 3-3). Как и в случае протеогликанов, занятыми оказываются не все возможные участки связывания.

Один класс гликопротеинов, обнаруженных в цитоплазме и ядре, уникален в том смысле, что гликозилированные участки белка содержат только единичные остатки N-ацетилглюкозамина, связанные О-гликозидной связью с гидроксильной группой боковой цепи серина. Эта модификация обратима и часто затрагивает те же остатки серина, что подвергаются фосфорилированию на некоторых этапах функционирования белка. Две названные модификации являются взаимноисключающими, а данный тип гликозилирования,

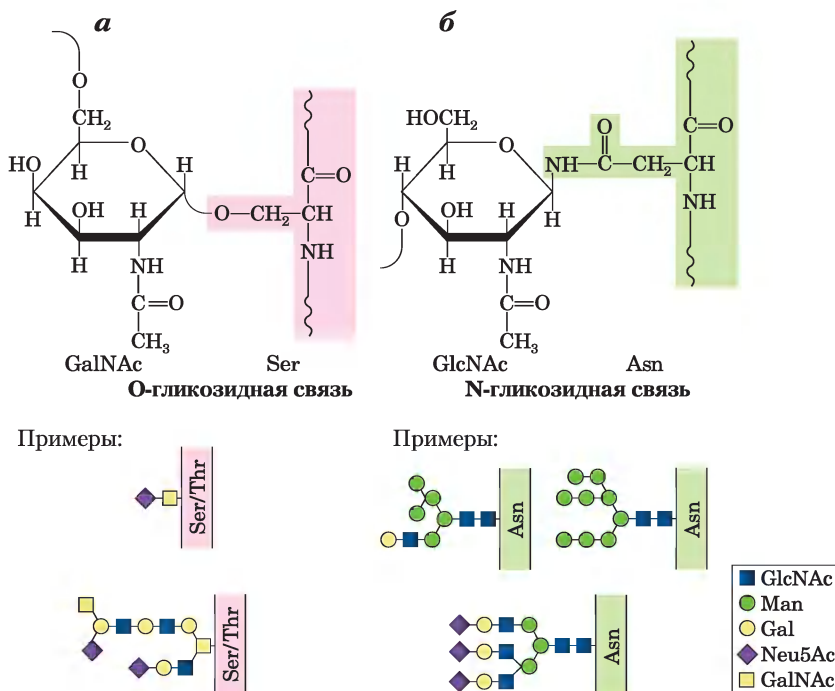


Рис. 7-29. Типы связывания олигосахаридов в гликопротеинах. а) Присоединение олигосахарида с помощью О-гликозидной связи происходит путем связывания с гидроксильной группой Ser или Thr (выделены розовым цветом); в данном случае на восстанавливающем конце олигосахаридной цепи расположен GalNAc. Показаны примеры одной простой и одной сложной олигосахаридной цепи. б) В олигосахаридах, присоединенных через N-гликозидную связь, связывание осуществляется с амидным азотом остатка Asn; здесь концевым остатком является GlcNAc. Приведены примеры трех распространенных типов олигосахаридных цепей, присоединяющихся с помощью N-гликозидной связи. Полное описание структуры олигосахарида требует определения положения и стереохимии (α/β) каждой гликозидной связи.

возможно, играет важную роль в регуляции активности белка. Мы поговорим об этом в гл. 12 при обсуждении вопросов, связанных с фосфорилированием белка.

Как мы увидим в гл. 11, на внешней поверхности плазматической мембраны сосредоточено множество мембранных гликопротеинов, к которым ковалентно прикреплены олигосахариды разной степени сложности. Одним из наиболее полно охарактеризованных мембранных гликопротеинов является гликофорин А мембраны эритроцита (рис. 11-7). Его массу на 60% составляют углеводы, образующие 16 олигосахаридных цепей, из 60–70 моносахаридных остатков, которые ковалентно соединены с аминокислотными остатками вблизи N-конца полипептидной цепи. Пятнадцать олигосахаридных цепей присоединены O-гликозидными связями к остаткам Ser или Thr, а одна — N-гликозидной связью к остатку Asn.

Гликомика — область биохимии, занимающаяся систематической характеристикой всех углеводных компонентов определенной клетки или ткани, в том числе тех, что связаны с белками и липидами. Гликомика также изучает, с какими белками связываются гликопротеины, и к какой аминокислоте в последовательности присоединяется каждый олигосахарид. Это сложное, но полезное исследование позволяет изучить характер гликозилирования в норме и его изменения при генетических заболеваниях и раке. Современные методы определения полного углеводного состава клетки в значительной степени определяются возможностями масс-спектрометрии (см. рис. 7-37). На сегодняшний день известно строение многих O- и N-связанных олигосахаридов из различных гликопротеинов; на рис. 7-29 представлено несколько типичных примеров. В гл. 27 мы рассмотрим механизмы связывания специфических белков с соответствующими олигосахаридными последовательностями.

Многие белки, секретируемые эукариотическими клетками, в том числе большинство белков крови, представляют собой гликопротеины. Например, иммуноглобулины (антитела) и некоторые гормоны, такие как фолликулостимулирующий, лютеинизирующий и тиреостимулирующий, являются гликопротеинами. Гликозилированы многие белки молока, например лактальбумин,

а также некоторые белки, выделяемые поджелудочной железой (рибонуклеаза); это же относится и к большинству белков лизосом.

До сих пор не до конца понятно, какие «биологические преимущества» достигаются при гликозилировании белков. Гидрофильные углеводные кластеры изменяют полярность и растворимость белков, к которым они прикрепляются. Олигосахаридные цепи, присоединенные к вновь синтезированным белкам в эндоплазматическом ретикулуме и окончательно сформированные в аппарате Гольджи, указывают место назначения, а также участвуют в контроле качества белков, указывая на подлежащие уничтожению неправильно свернутые белки (рис. 27-39). Когда многочисленные отрицательно заряженные олигосахаридные цепи образуют кластер в определенном участке белка, возникает отталкивание, которое способствует возникновению на данном участке вытянутой, палочковидной структуры. Большие размеры и отрицательный заряд олигосахаридных цепей предохраняют некоторые белки от атаки протеолитическими ферментами. Кроме подобного глобального влияния на структуру белка олигосахаридные цепи оказывают и более специфическое воздействие (разд. 7.4). Важная роль нормального гликозилирования белка становится очевидной, если учесть, что, по крайней мере, 18 различных наследственных нарушений гликозилирования у человека связаны с тяжелыми патологиями физического и умственного развития, а некоторые из этих нарушений фатальны.

Гликолипиды и липополисахариды — компоненты мембран

В клетке не только гликопротеины содержат сложные олигосахаридные цепи. Некоторые липиды также ковалентно связаны с олигосахаридами. **Ганглиозиды** — мембранные липиды эукариотических клеток; полярная головка липида, участвующая в образовании внешней поверхности мембраны, представляет собой сложный олигосахарид, содержащий сиаловую кислоту (рис. 7-9) и другие остатки моносахаридов. Некоторые олигосахаридные цепи ганглиозидов, например те, что определяют группу крови человека (рис. 10-15), идентичны олигосахаридам, обнаруженным в составе некоторых гликопроте-

инов, по которым, следовательно, также можно определять группу крови. Подобно олигосахаридным цепям гликопротеинов, олигосахариды мембранных липидов обычно (возможно, всегда) располагаются на внешней поверхности плазматической мембраны.

Липополисахариды являются характерной особенностью мембраны грамотрицательных бактерий, таких как *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Эти молекулы в первую очередь узнаются антителами, вырабатываемыми иммунной системой в ответ на бакте-

риальную инфекцию, и, следовательно, могут служить важными отличительными признаками серотипа бактериального штамма (*серотипы* — это штаммы, различающиеся антигенными свойствами). Липополисахариды *S. typhimurium* содержат шесть жирных кислот, связанных с двумя остатками глюкозамина, к одному из которых прикрепляется сложный олигосахарид (рис. 7-30). Мембрана *E. coli* построена из похожих по структуре, но других липополисахаридов. Липополисахариды некоторых бактерий токсичны для человека и животных; например,

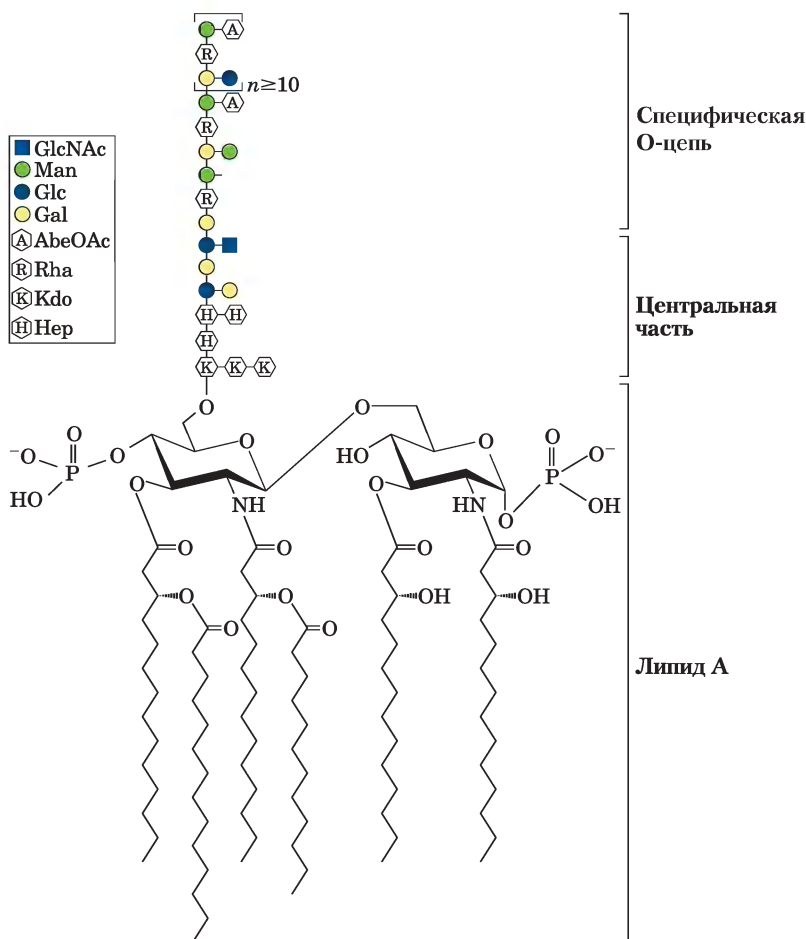


Рис. 7-30. Липополисахариды бактерий. Строение липополисахарида внешней мембраны *Salmonella typhimurium*; Kdo — 3-дезоксид-D-манно-октулозоновая кислота, Hep — L-глицеро-D-манно-гептоза, AbeOAc — абеквоза (3,6-дидезоксигалактоза), ацетилированная по одной из гидроксильных групп. Липидная часть молекулы (липид А) содержит шесть жирных кислот. Разные бактерии несколько различаются строением липополисахаридов, но все они содержат липидный участок (липид А), центральный олигосахарид и специфическую O-цепь, определяющую серотип бактерии (ее иммуногенность). Внешние мембраны грамотрицательных бактерий *S. typhimurium* и *E. coli* содержат так много молекул липополисахаридов, что практически вся поверхность этих бактериальных клеток покрыта специфическими O-цепями.

они отвечают за резкое снижение кровяного давления при инфекционно-токсическом шоке, вызванном грамотрицательными бактериями. ■

Краткое содержание раздела 7.3

ГЛИКОКОНЪЮГАТЫ: ПРОТЕОГЛИКАНЫ, ГЛИКОПРОТЕИНЫ И ГЛИКОЛИПИДЫ

- Протеогликианы представляют собой гликоконъюгаты, в которых коровый белок ковалентно связан с одним или несколькими большими молекулами гликанов — гепарансульфатом, хондроитинсульфатом или кератансульфатом. Почти вся масса протеогликана приходится на долю гликанов. Протеогликианы связываются с внешней поверхностью плазматической мембраны посредством трансмембранного пептида или ковалентно связанного липида и обеспечивают участки прикрепления, узнавания и передачи информации между клетками или клетками и внеклеточным матриксом.
- Гликопротеины содержат ковалентно связанные олигосахариды, которые меньше по размеру, но более сложно организованы (и, следовательно, несут больше информации), чем гликозаминогликаны. Многие белки клеточной поверхности, внеклеточные белки и большинство секретируемых белков являются гликопротеинами. Ковалентно связанные с белком олигосахариды влияют на фолдинг и устойчивость белков, а также сообщают необходимую информацию относительно пути следования вновь синтезированных белков и обеспечивают специфическое узнавание другими белками.
- Определением полного состава сахаросодержащих молекул клетки или ткани, а также изучением функций всех этих молекул занимается специальный раздел биохимии — гликомика.
- Гликолипиды растений и животных и липополисахариды бактерий — это компоненты покровов их клеток; на внешней поверхности к ним ковалентно прикреплены цепи олигосахаридов.

7.4. Углеводы как информационные молекулы: сахарный код

Гликобиология изучает состав, строение и функции гликоконъюгатов; сегодня эта наука является одной из наиболее активно развивающихся и удивительных областей биохимии и клеточной биологии. Уже понятно, что клетки используют специфические олигосахариды для кодирования важной информации, касающейся внутриклеточного транспорта белков, межклеточных взаимодействий, развития тканей и передачи внеклеточных сигналов. Мы обратимся лишь к нескольким примерам, иллюстрирующим разнообразие структуры и диапазон биологической активности гликоконъюгатов. В гл. 20 мы обсудим детали биосинтеза полисахаридов, в том числе пептидогликанов, а в гл. 27 — механизмы сборки олигосахаридных цепей в гликопротеинах.

Совершенствование методов определения строения молекул олигосахаридов и полисахаридов позволило выявить удивительную сложность и разнообразие олигосахаридных цепей в гликопротеинах и гликолипидах. Взгляните на типичные олигосахариды гликопротеинов, изображенные на рис. 7-29. Наиболее сложный из них содержит 14 моносахаридных остатков четырех видов, связанных между собой связями 1→2, 1→3, 1→4, 1→6, 2→3 и 2→6, некоторые из связей имеют α-, а другие — β-конфигурацию. В олигосахаридах довольно распространены разветвленные структуры, не встречающиеся в нуклеиновых кислотах и белках. Если предположить, что для образования олигосахарида может быть использовано 20 различных моносахаридных звеньев (что вполне возможно), то расчетное число гексамерных олигосахаридов составит $1,44 \cdot 10^{15}$. В то же время из 20 аминокислот можно построить $6,4 \cdot 10^7$ (20^6) гексапептидов, а из четырех нуклеотидных звеньев — 4096 (4^6) гексануклеотидов. Если же еще учесть возможность сульфатирования остатков сахаров, то полученная цифра вырастет еще на два порядка. Олигосахариды необычайно богаты структурной информацией; ее объем не только сравним, но намного превосходит объем информации, содержащейся в молекуле нуклеиновой кислоты среднего размера. Каждый из олигосахаридов, изображенных на рис. 7-29, характеризуется уникальной пространственной

структурой «сахарным кодом», который умеют расшифровывать взаимодействующие с ними белки.

Лектины — белки, «читающие» сахарный код и участвующие во многих биологических процессах

Лектины присутствуют во всех организмах. Это белки с высоким сродством и специфичностью связываются с определенными углеводами (табл. 7-3). Лектины принимают участие во многих процессах узнавания, передачи сигнала и адгезии клеток, а также во внутриклеточном транспорте вновь синтезированных белков. В лаборатории очищенные лектины используют для обнаружения и разделения гликопротеинов с различными олигосахаридными цепями. Здесь мы остановимся лишь на нескольких примерах, иллюстрирующих значение лектинов в животной клетке.

Некоторые циркулирующие в крови пептидные гормоны содержат остатки сахаров, определяющие время их жизни. Лютеинизирующий и тиреотропный гормоны (пептидные гормоны передней доли гипофиза) содер-

жат присоединенные N-гликозидной связью олигосахариды с концевым дисахаридом GalNAc4S(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc, который узнается лектином (рецептором) гепатоцитов (GalNAc4S — это N-ацетилгалактозамин, сульфатированный по —ОН-группе атома С-4). Взаимодействие рецептора с гормоном регулирует захват и деградацию лютеинизирующего и тиреотропного гормонов и, следовательно, их концентрацию в крови. Таким образом, уровень этих гормонов в крови то повышается в результате секреции надпочечниками, то падает в результате постоянного разрушения в гепатоцитах.

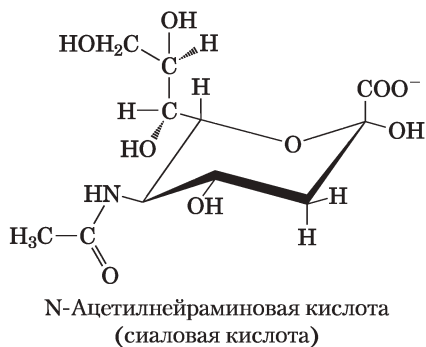
Остатки сиаловой кислоты (Neu5Ac), расположенные на концах олигосахаридных цепей многих гликопротеинов плазмы крови (рис. 7-29), защищают эти белки от разрушения в печени. Например, медьсодержащий сывороточный гликопротеин церулоплазмин имеет несколько олигосахаридных цепей с Neu5Ac на конце. Удаление остатков сиаловой кислоты ферментом сиалидазой (другое название — нейраминидаза) используется клеткой для мечения «старых» белков, которые необходимо уничтожить и заменить другими. Плазматическая мембрана гепатоцитов содержит молекулы лектинов,

Таблица 7-3 Некоторые лектины и их олигосахаридные лиганды

Лектин и его источник	Сокращенное обозначение	Лиганд(ы)
Растения		
Конканавалин А	ConA	Man α 1—OCH ₃
Лектин 4 из <i>Griffonia simplicifolia</i>	GS4	Тетрасахарид Lewis b (Le ^b)
Агглютинин зародышей пшеницы	WGA	Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc GlcNAc(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc
Рицин		Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc
Животные		
Галектин-1		Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc
Маннозосвязывающий белок А	MBP-A	Богатый маннозой октасахарид
Вирусы		
Гемагглютинин вируса гриппа А	HA	Neu5Ac(α 2 \rightarrow 6)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc
Белок вируса полиомы 1	VP1	Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc
Бактерии		
Энтеротоксин	LT	Gal
Токсин холеры	CT	Пентасахарид GM1

Источник: Weiss, W.I. & Drickamer, K. (1996) Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 441–473.

называемых рецепторами асиалоггликопротеинов (т. е. десиалированных гликопротеинов). Эти рецепторы способны специфическим образом связывать олигосахаридные цепи, в которых остатки галактозы больше не защищены концевым остатком Neu5Ac. Взаимодействие рецептора с церулоплазмином приводит к эндоцитозу и уничтожению церулоплазмину.



Возможно, похожий механизм работает в организме млекопитающих для удаления из кровотока старых эритроцитов. Молодые эритроциты несут несколько мембранных гликопротеинов с олигосахаридными цепями, заканчивающимися Neu5Ac. Если в эксперименте *in vitro* удалить остатки сиаловой кислоты из образца крови с помощью сиалидазы, а затем вернуть эту кровь в циркуляцию, то подвергшиеся такой процедуре эритроциты исчезают в течение нескольких часов. Эритроциты с интактными олигосахаридными цепями (те, что были отобраны и возвращены в кровоток без обработки сиалидазой) циркулируют в организме еще несколько дней.

Лектины клеточной поверхности играют важную роль в развитии некоторых заболеваний человека, причем это относится как к лектинам человека, так и к лектинам инфицирующего агента. **Селектинами** называют лектины плазматической мембраны, обеспечивающие узнавание и адгезию клеток в широком спектре клеточных процессов, например при перемещении клеток иммунной системы (нейтрофилов) из крови через стенку капилляра к воспаленным или инфицированным участкам тканей (**рис. 7-31**). В инфицированном участке Р-селектин, расположенный на поверхности эндотелиальной клетки капилляра, взаимодействует с определенным олигосахаридом гликопротеина циркулирующего нейтрофила. Это взаимодействие замедляет движение нейтрофила и заставляет его «перекатываться» по эндотелию капилляра. Далее происходит взаимодействие между молекулами интегрина (с. 641) на плазматической мембране нейтрофила и адгезионным белком на поверхности эндотелия. Это взаимодействие окончательно останавливает передвижение нейтрофила и позволяет ему проникнуть сквозь стенку капилляра к инфицированной ткани, что-

кулирующего нейтрофила. Это взаимодействие замедляет движение нейтрофила и заставляет его «перекатываться» по эндотелию капилляра. Далее происходит взаимодействие между молекулами интегрина (с. 641) на плазматической мембране нейтрофила и адгезионным белком на поверхности эндотелия. Это взаимодействие окончательно останавливает передвижение нейтрофила и позволяет ему проникнуть сквозь стенку капилляра к инфицированной ткани, что-

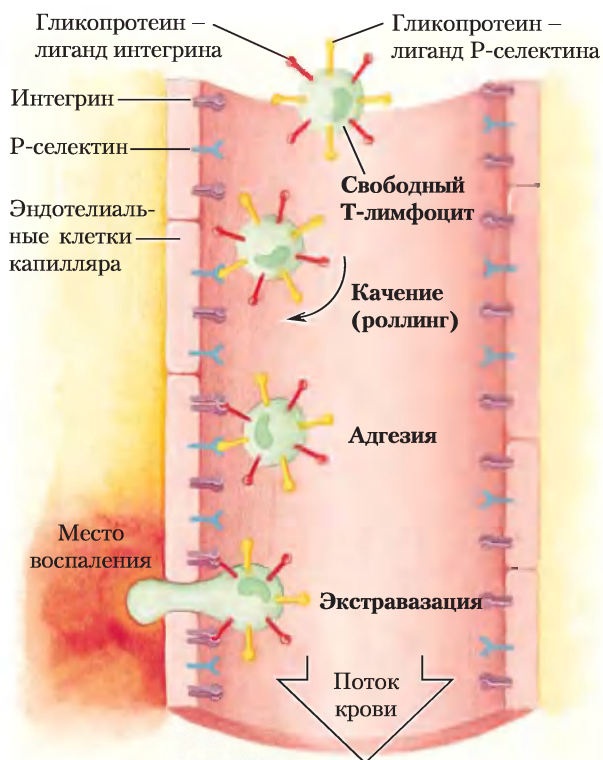


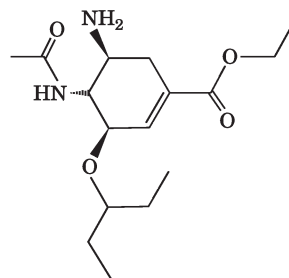
Рис. 7-31. Взаимодействия лектинов с лигандами при миграции лимфоцитов к местам воспаления или повреждения. Движение нейтрофила в капилляре замедляется из-за краткосрочных взаимодействий между молекулами Р-селектина на плазматических мембранах эпителиальных клеток капилляра и лигандами Р-селектина на поверхности нейтрофила. По мере взаимодействия нейтрофила с расположенными на поверхности эпителия молекулами Р-селектина его «перекатывание» по стенке капилляра замедляется. В области воспаления более сильное взаимодействие между интегринами на поверхности капилляра и их лигандами на нейтрофиле полностью тормозит движение нейтрофила. Под влиянием сигналов от места воспаления происходит экстравазация — нейтрофил проходит сквозь стенку капилляра к месту воспаления.

бы начать иммунную атаку. В описанном процессе (так называемом хоуминге лимфоцитов) участвуют еще два типа селектинов: E-селектины на эндотелиальных клетках и L-селектины на нейтрофилах связывают определенные олигосахариды на нейтрофилах и клетках эндотелия соответственно.

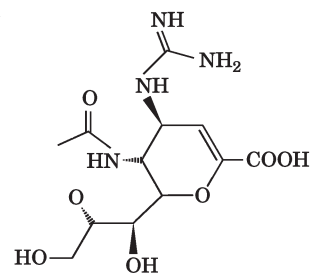
Селектины человека участвуют в формировании воспалительного процесса при ревматоидном артрите, астме, псориазе, рассеянном склерозе и отторжении трансплантированных органов. С этим связана острая необходимость создания лекарств, ингибирующих адгезию клеток, опосредованную селектинами. Многие клетки карциномы экспрессируют антиген, который в норме присутствует только на клетках плода (сиалил-Льюис x, или сиалил-Le^x), а при попадании в циркулирующую кровь способствует распространению раковых клеток и метастазированию. Углеводные производные, имитирующие сиалил-Le^x в составе сиалогликопротеинов, а также те, что изменяют путь биосинтеза олигосахаридов, могут оказаться эффективными лекарственными препаратами для лечения хронических воспалительных заболеваний или для борьбы с метастазами при раке.

Некоторые вирусы животных, в том числе вирус гриппа, прикрепляются к клеткам хозяина с помощью олигосахаридов, находящихся на поверхности клеток. Лектин вируса гриппа, известный как белок HA (гемагглютинин), играет важную роль в проникновении вируса и развитии инфекции. После того как вирус проник в клетку хозяина и реплицировался, новосинтезированные вирусные частицы выходят из клетки, обернутые кусочками ее плазматической мембраны. Вирусная сиалидаза (нейраминидаза) удаляет концевой остаток сиаловой кислоты в олигосахаридах на поверхности клетки хозяина, тем самым вирусные частицы отделяются от клетки и не происходит их слипания друг с другом. После этого начинается новая стадия заражения. Для лечения гриппа применяют противовирусные препараты осельтамивир (тамифлю) и занамивир (реленза). В основе этих лекарств производные сахаров; они ингибируют вирусную сиалидазу, конкурируя за связывание с олигосахаридами клетки хозяина. Это предотвращает высвобождение вирусов из зараженной клетки и застав-

ляет вирусные частицы слипаться, таким образом блокируя следующую стадию инфекции.



Осельтамивир
(Тамифлю)



Занамивир
(Реленза)

На первой стадии инфекционного цикла вирусов простого герпеса HSV-1 и HSV-2 (возбудители герпеса ротовой полости и гениталий соответственно) происходит специфическое связывание лектинов вируса с гепарансульфатом на поверхности клеток хозяина, причем для развития инфекции необходима правильная локализация сульфатных групп в этой биомолекуле.

С помощью лектинов некоторые патогенные микробы прикрепляются к клеткам хозяина или вводят в них свой токсин. Причиной развития большинства случаев язвенной болезни желудка, как показали в 1980-х гг. Барри Дж. Маршалл и Дж. Робин Уоррен, является бактерия *Helicobacter pylori*, которая прикрепляется к внутренней стенке желудка путем взаимодействия между лектинами на бактериальной оболочке и специфическими олигосахаридами в мембранных гликопротеинах эпителия желудка (рис. 7-32). Одним из участков узнавания *H. pylori* служит олигосахарид Le^b — фрагмент детерминанты группы крови 0 (I). Этот факт помогает объяснить, почему язва желудка в несколько раз чаще



Барри Дж. Маршалл



Дж. Робин Уоррен

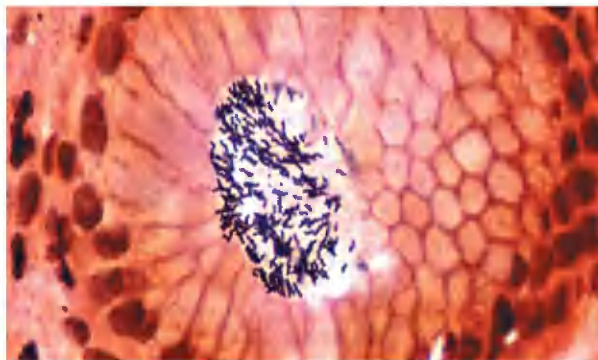


Рис. 7-32. Образование язвы желудка. Клетки *Helicobacter pylori*, прикрепившиеся к стенке желудка. Язва возникает в результате взаимодействия бактериального лектина и олигосахарида Le^b (антигена группы крови 0) на поверхности эпителия желудка.

возникает у людей с группой крови 0, чем у людей с остальными группами крови. Для лечения язвы желудка могут оказаться полезными аналоги Le^b, синтезированные химическим путем. Конкурируя с гликопротеинами желудка за связывание с бактериальными лектинами, они способны предотвратить адгезию бактерии и, следовательно, развитие инфекции.

Некоторые наиболее тяжелые паразитарные инфекционные заболевания человека, распространенные в основном в слаборазвитых странах, вызываются эукариотическими микроорганизмами, имеющими на клеточной поверхности необычные олигосахариды, выполняющих в клетках некоторых паразитов защитную функцию. Среди этих организмов можно назвать трипаносомы, ответственные за африканскую сонную болезнь и болезнь Шагаса, *Plasmodium falciparum*, вызывающую малярию, и *Entamoeba histolytica* — причина амёбной дизентерии. В связи с поиском лекарств, останавливающих синтез этих необычных олигосахаридных цепей и репликацию паразитов, был предпринят ряд исследований, посвященных путям биосинтеза этих олигосахаридов.

Холерный токсин, вырабатываемый *Vibrio cholerae*, проникает в клетки кишечника, отвечающие за всасывание воды, и вызывает диарею. Токсин связывается с клетками-мишенями через олигосахарид ганглиозида GM1 — мембранного фосфолипида на поверхности кишечного эпителия (строение GM1 изображено в доп. 10-2, рис. 1). Аналогичным образом токсин, выра-

батываемый возбудителем коклюша *Bordetella pertussis*, проникает в клетки-мишени только после взаимодействия с одним или, возможно, несколькими олигосахаридами, имеющими на конце цепи остаток сиаловой кислоты. Изучение строения участков связывания олигосахаридов в этих токсинах (лектинах) поможет в создании генно-инженерных аналогов токсинов для вакцинации. Генно-инженерные аналоги токсинов, не имеющие участка связывания углеводов, безопасны для человека, поскольку не могут связываться с клеткой и проникать внутрь, но могут вызывать иммунный ответ, который предохранит бы человека от последующего воздействия природного токсина. Возможно также представить себе лекарство, которое имитирует олигосахариды клеточной поверхности, связывается с бактериальными лектинами и предотвращает их продуктивное связывание с поверхностью клетки.

Лектины проявляют свою активность и внутри клетки. В аппарате Гольджи олигосахарид, содержащий маннозо-6-фосфат, метит вновь синтезированные белки, которые предназначены для транспортировки в лизосомы (рис. 27-39). Общая особенность строения этих гликопротеинов состоит в наличии своеобразного сигнального участка, что обеспечивает их узнавание ферментом, фосфорилирующим остаток маннозы на конце олигосахаридной цепи. Образующийся в результате остаток маннозо-6-фосфата узнается катион-зависимым маннозофосфатным рецептором, представляющим собой мембраносвязанный лектин, который имеет центр связывания маннозофосфата на люменальной поверхности аппарата Гольджи. Когда участок аппарата Гольджи, содержащий этот рецептор, отпочковывается в виде транспортной везикулы, белки с маннозофосфатными остатками включаются в формирующуюся везикулу, при этом маннозо-6-фосфат взаимодействует со своим рецептором. Затем везикулы сливаются с лизосомами и высвобождают свое содержимое. Многие, если не все, гидролитические ферменты лизосом захватываются и переносятся именно по такому механизму. Некоторые рецепторы маннозо-6-фосфата могут захватывать ферменты, содержащие остатки маннозо-6-фосфата, и направлять их в лизосомы. Этот процесс лежит в основе «заместительной ферментативной терапии», целью которой является коррекция нарушений, связанных с активностью лизосом у человека. ■

Кроме того, лектины участвуют в процессах, связанных с сортировкой белков. Любой вновь синтезированный в эндоплазматическом ретикулуме белок уже связан с определенным олигосахаридом, который может быть присоединен с помощью одного из двух лектинов ЭР (одновременно они выполняют функцию шаперонов): мембраносвязанного **кальнексина** и находящегося в растворе **кальретикулина**. Эти лектины связывают новый белок с ферментом, который осуществляет быстрый дисульфидный обмен в процессе укладки белка, в конечном итоге приводящий к образованию нативной конформации. В этот момент ферменты в ЭР обрабатывают олигосахаридные остатки таким образом, чтобы они узнавались другим лектином, ERGIC53, который направляет сформированный белок (гликопротеин) в аппарат Гольджи для дальнейшего созревания. Если белок упакован неверно, олигосахариды обрабатываются иным образом и узнаются лектином EDEM, который направляет аномально упакованный белок в цитозоль, где тот уничтожается. Таким образом, гликозилирование белков в ЭР служит определенным сигналом, позволяющим клетке элиминировать неправильно сформированные белки (более подробно этот процесс обсуждается в гл. 27).

Взаимодействие лектина с углеводом очень прочное и высокоспецифичное

Во всех описанных выше функциях лектинов и во многих других, связанных со взаимодействиями между лектинами и олигосахаридами, важна уникальная структура олигосахарида, обеспечивающая высокую специфичность взаимодействия. Информация, содержащаяся в олигосахаридах, выражается в виде своеобразного кода с практически бесконечным набором коротких «слов», распознаваемых отдельными белками. Центры связывания олигосахаридов в молекулах лектинов комплементарны строго определенным углеводным последовательностям, в результате чего взаимодействие лектинов с олигосахаридами отличается чрезвычайно высокой специфичностью. Сродство олигосахарида к каждому углеводсвязывающему домену лектина часто велико (значения K_d находятся в микромолярном диапазоне), однако эффективное сродство многократно усиливается благодаря мультивалентности лектинов, поскольку каждая молекула

лектина имеет множество углеводсвязывающих доменов. В кластерах олигосахаридов (которые обычно образуются на поверхности мембраны), например, каждый олигосахарид, связываясь с одним из углеводсвязывающих доменов лектина, усиливает дальнейшее взаимодействие. Если на поверхности клетки существует множество рецепторов, avidность взаимодействия может быть очень высокой и обеспечивать такие высококооперативные процессы, как прикрепление и перекатывание клеток (см. рис. 7-31).

Некоторые комплексы лектинов с углеводами были детально изучены методом рентгеноструктурного анализа (РСА), благодаря чему была предложена модель взаимодействий (**рис. 7-33**). Семейство из 11 лектинов, которые связывают олигосахаридные цепи, оканчивающиеся на остаток сиаловой кислоты, выполняет в организме человека несколько важных биологических функций. Все эти лектины связывают сиаловые кислоты в доменах со структурой β -сэндвича, подобных тем, что обнаружены в иммуноглобулинах (этот мотив изображен в белке CD8 на рис. 4-21). Все члены семейства носят название **siglec** (*sialic acid-recognizing Ig-superfamily lectins*) и имеют номера от 1 до 11; иногда иначе их называют **сиалоадгезинами**. Во взаимодействии siglec с сиаловой кислотой (N-ацетилнейраминовой кислотой, Neu5Ac) участвуют все заместители в кольце Neu5Ac: ацетогруппа у атома C-5 образует водородные связи и вступает в ван-дер-ваальсовы взаимодействия с белком, карбоксильная группа образует солевой мостик с консервативным остатком Arg, а гидроксильные группы остатка глицерина — водородные связи с белком. Лектины siglecs регулируют процессы в иммунной и нервной системе, а также участвуют в развитии клеток крови. Например, siglec-7 связывается со специфическим ганглиозидом (GD3), содержащим два остатка сиаловой кислоты, и подавляет активность естественных клеток-киллеров (NK-клеток), сберегая тем самым клетки, которые должны уничтожаться иммунной системой. При некоторых онкозаболеваниях, таких как злокачественная меланома и нейробластома, повышенный уровень GD3 возможно приводит к тому, что клетки опухоли преодолевают защитный механизм иммунной системы.

Структура другого лектина — рецептора маннозо-6-фосфата — тоже была определена ме-

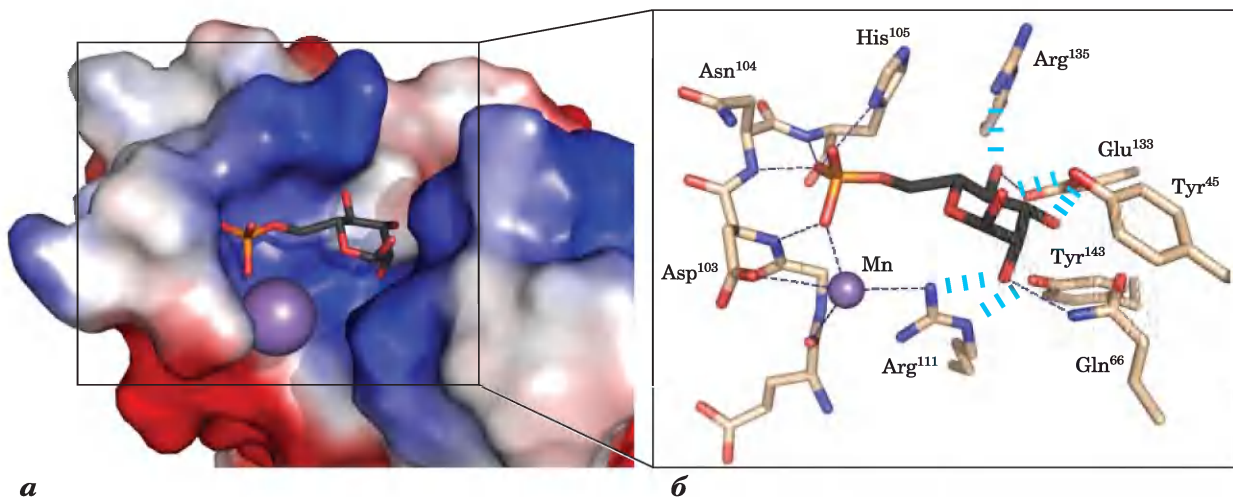


Рис. 7-33. Взаимодействия лектина с углеводом. *а)* Рецептор маннозо-6-фосфата быка с маннозо-6-фосфатом (PDB ID 1M6P) на поверхности; цветом обозначено распределение заряда: красные области несут преимущественно отрицательный заряд, синие — преимущественно положительный заряд. Молекула маннозо-6-фосфата изображена в виде стержневой структуры; ион марганца выделен фиолетовым цветом. *б)* Центр связывания в увеличенном виде. Маннозо-6-фосфат образует водородную связь с остатком Arg¹¹¹ и координационную связь с ионом Mn²⁺ (для ясности размер Mn²⁺ увеличен по сравнению с ван-дер-ваальсовым радиусом). Остаток His¹⁰⁵ образует водородную связь с одним из атомов кислорода в фосфатной группе. Возможно, именно протонирование этого остатка при более низком рН в лизосоме приводит к высвобождению маннозо-6-фосфата рецептором.

тодом РСА. Удалось выяснить детали взаимодействий этого лектина с маннозо-6-фосфатом, объяснить специфичность связывания и необходимость участия двухвалентного катиона (рис. 7-33, *а*). Остаток Arg¹¹¹ в молекуле рецептора образует водородную связь с гидроксильной группой у атома С-2 остатка маннозы, который связан координационной связью с ионом Mn²⁺. Остаток His¹⁰⁵ образует водородную связь с одним из атомов кислорода в фосфатной группе (рис. 7-33, *б*). При попадании белка, связанного с маннозо-6-фосфатом, в лизосому, где рН ниже, чем в аппарате Гольджи, сродство рецептора к маннозо-6-фосфату снижается. Причиной этого, возможно, является протонирование остатка His¹⁰⁵.

Кроме названных специфических взаимодействий существуют и более общие взаимодействия, которые также вносят вклад в связывание многих углеводов с соответствующими лектинами. Например, многие остатки сахаров имеют более полярную и менее полярную стороны (**рис. 7-34**). Более полярные участки образуют

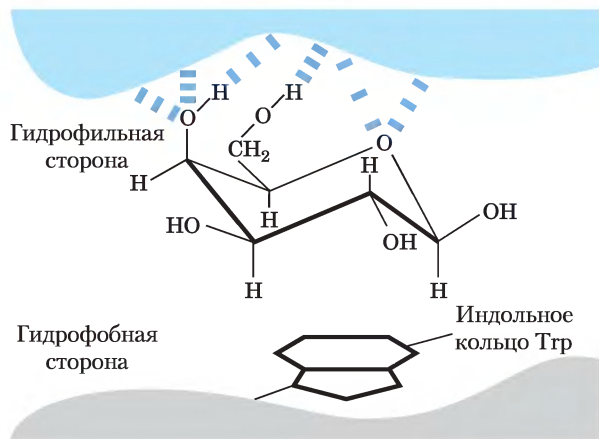


Рис. 7-34. Гидрофобные взаимодействия остатков сахаров. Мономерные звенья сахаров, таких как галактоза, имеют более полярную сторону (в верхней части кресла, где расположены кислород и гидроксильные группы), участвующую в образовании водородных связей с лектином, и менее полярную сторону, которая может вступать в гидрофобные взаимодействия с неполярными аминокислотными остатками, такими как индольное кольцо триптофана.

водородные связи с лектином, а менее полярные участвуют в гидрофобных взаимодействиях с неполярными аминокислотными остатками белка. В результате всех этих взаимодействий возникает высокое сродство (часто $K_d \leq 10^{-8}$ М) и высокая специфичность связывания. В этом состоит

один из возможных способов передачи информации, который оказывается ключевым во многих внутриклеточных процессах и взаимодействиях между клетками. На **рис. 7-35** представлены некоторые биологические процессы, в которых сахара выступают как носители информации.

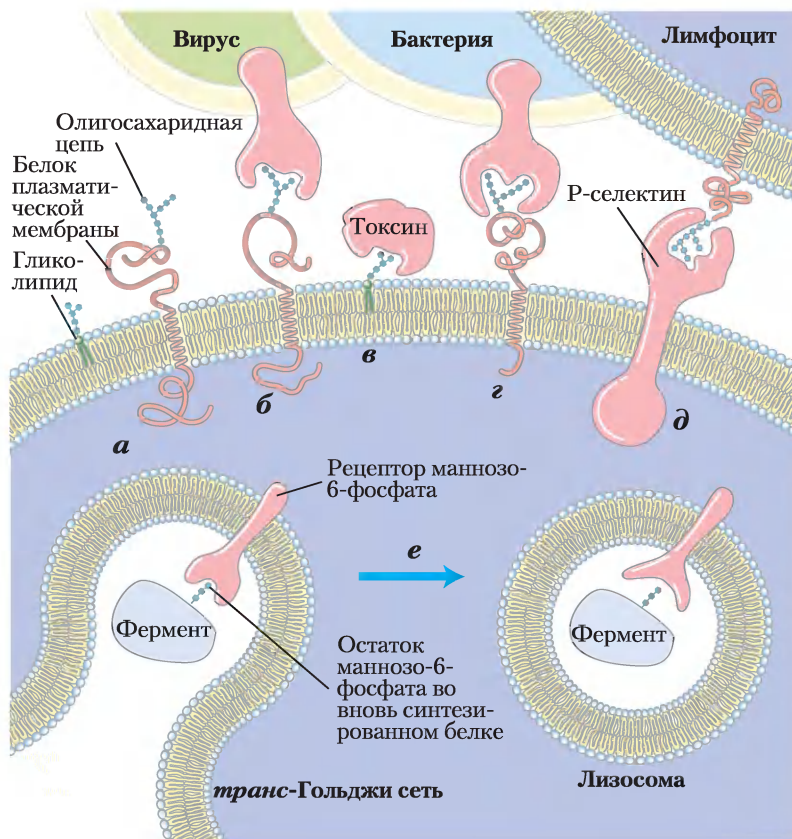


Рис. 7-35. Участие сахаров в процессах узнавания и адгезии на поверхности клеток.

а) Олигосахариды уникального строения (изображены в виде последовательности шестичленных колец), входящие в состав различных гликопротеинов или гликолипидов на внешней поверхности плазматической мембраны, с высоким сродством и специфичностью взаимодействуют с внеклеточными лектинами. **б)** Инфицирующие клетки животных вирусы, такие как вирус гриппа, на первой стадии инфекционного цикла связываются с гликопротеинами на поверхности клетки. **в)** Бактериальные токсины (например, холеры или коклюша) для проникновения в клетку связываются с гликолипидом на клеточной поверхности. **г)** Некоторые бактерии (в частности, *Helicobacter pylori*) прикрепляются к клетке хозяина, а затем колонизируют или инфицируют ее. **д)** Селектины (лектины) в плазматической мембране некоторых клеток выступают в качестве посредников в межклеточных взаимодействиях, в частности во взаимодействии Т-лимфоцитов с эндотелиальными клетками капилляров в участке воспаления. **е)** Рецептор маннозо-6-фосфата (маннозосвязывающий лектин) в транс-Гольджи сети связывает олигосахарид лизосомального фермента и способствует его переносу в лизосому.

Краткое содержание раздела 7.4 УГЛЕВОДЫ КАК ИНФОРМАЦИОННЫЕ МОЛЕКУЛЫ: САХАРНЫЙ КОД

- Разнообразное сочетание моносахаридов может привести к почти бесконечному числу олигосахаридов, которые различаются по стереохимии и положению гликозидной связи, типу и ориентации заместителей, числу и типу разветвлений. Олигосахариды несут в себе гораздо больше информации, чем молекулы нуклеиновых кислот или белков.
- Лектины — белки со специфическими углеводсвязывающими участками; обычно они располагаются на внешней поверхности клетки, где инициируют взаимодействия с другими клетками. Лектины позвоночных по олигосахаридным «ярлыкам» узнают некоторые пептидные гормоны, циркулирующие белки плазмы и клетки крови и регулируют их уничтожение.
- Прикрепление патогенных вирусов, бактерий и некоторых эукариотических паразитов к клеткам организма-хозяина происходит через связывание лектинов на клетках патогенов с олигосахаридами на поверхности клеток хозяина.
- Внутриклеточные лектины участвуют в доставке внутриклеточных белков к определенным органеллам или к месту их секреции.
- Комплексы лектинов с сахарами были изучены методом рентгеноструктурного анализа; была установлена комплементарность этих молекул, объясняющая прочность и специфичность их взаимодействий.

7.5. Методы анализа углеводов

Растущее понимание важной роли олигосахаридов в процессах биологического узнавания стимулировало развитие методов изучения структуры и стереохимии сложных олигосахаридов. Эти исследования были затруднены тем, что в отличие от пептидов и нуклеиновых кис-

лот олигосахариды могут иметь разветвленную цепь, в которой встречаются связи разных типов. Высокая плотность зарядов многих полисахаридов и олигосахаридов и относительная лабильность сульфатных эфиров в гликозаминогликанах только усугубляют эти трудности.

Для простых линейных полимеров, таких как амилоза, положение гликозидных связей определяют, обрабатывая исходный полисахарид метилиодидом в сильнощелочной среде, в результате чего все свободные гидроксильные группы метилируются и становятся кислотоустойчивыми, а затем метилированный полисахарид гидролизуют в кислоте. В полученных при этом производных моносахаридов свободные гидроксильные группы как раз те, что участвовали в образовании гликозидных связей в исходном полимере. Для определения последовательности моносахаридных звеньев и имеющих разветвлений используют ферменты экзогликозидазы с известной специфичностью: они по очереди отщепляют моносахаридные остатки от невозстанавливающего конца цепи. Специфичность этих экзогликозидаз часто позволяет определить положение и стереохимию каждой связи.

Для определения строения олигосахаридной части гликопротеинов и гликолипидов их расщепляют ферментативно. Гликозидазы специфически расщепляют O- или N-олигосахаридные связи, а липазы удаляют «головки» липидов. Кроме того, связанные O-гликозидной связью гликаны можно выделить из гликопротеинов, обработав гидразином. Разделить полученную смесь сахаров на отдельные компоненты можно разными способами (**рис. 7-36**), включая те, что применяются при разделении белков и аминокислот: дробное осаждение растворителями, ионообменная и эксклюзионная хроматография (см. рис. 3-17). Для разделения смесей сахаров часто применяют аффинную хроматографию на модифицированном очищенными лектинами носителе (см. рис. 3-17, в).

При гидролизе олигосахаридов и полисахаридов под действием сильных кислот образуется смесь моносахаридов, которые можно идентифицировать хроматографическими методами и, таким образом установить общий состав полимера.

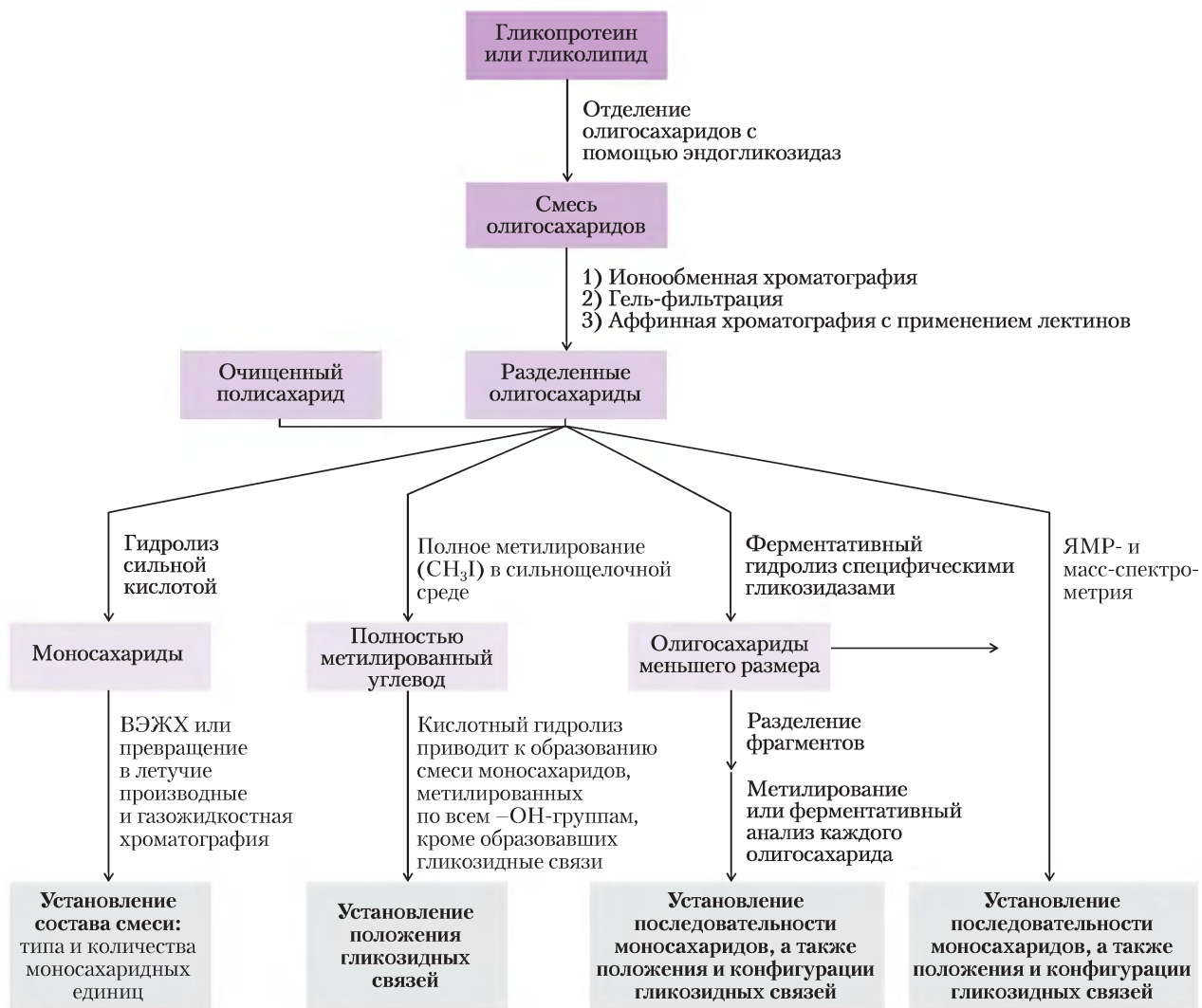


Рис. 7-36. Установление состава и строения углеводов. Для полной характеристики предварительно очищенного углевода иногда приходится применить все четыре аналитических подхода.

Анализ олигосахаридов все чаще осуществляется методами масс-спектрометрии и ЯМР-спектрометрии высокого разрешения. В случае таких полярных соединений, как олигосахариды, можно использовать методы масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбционной ионизацией (MALDI) и тандемной масс-спектрометрии (доп. 3-2). Метод MALDI настолько чувствителен, что позволяет определять молекулярную массу ионов (в данном случае целых олигосахаридных цепей; **рис. 7-37**). Методом тандемной масс-спектрометрии определяют молекулярную

массу как ионов, так и их фрагментов, возникающих в результате разрыва гликозидных связей. По данным ЯМР (доп. 4-5) можно определить последовательность моносахаридов, положение связи и конфигурацию при аномерных атомах, особенно если дело касается олигосахаридов среднего размера. Например, структура участка гепарина, пространственная модель которой представлена на **рис. 7-22**, полностью была установлена по данным ЯМР-спектроскопии. Для рутинного определения строения олигосахаридов используют автоматизированные методы и

специальные приборы, однако определение последовательности разветвленного олигосахарида с несколькими типами связей остается до сих пор гораздо более сложной задачей, чем определение линейной последовательности белка или нуклеиновой кислоты.

Важная роль при анализе сахаров отводится химическому синтезу. Этот метод широко используется для изучения биологических функций гликозаминогликанов и олигосахаридов. Химия подобных процессов сложна, но современные методы позволяют синтезировать короткие фрагменты практически любого гликозаминогликана с требуемой стереохимической структурой, длиной и расположением сульфатных групп, причем синтезируемые олигосахариды могут иметь гораздо более сложное строение чем те, что изображены на рис. 7-29. Твердофазный синтез олигосахаридов основан на тех же принципах, что и синтез пептидов, и имеет те же преимущества (см. рис. 3-29). Однако в химии углеводов могут применяться особые приемы: защитные группы и активирующие группы должны обеспечивать синтез гликозидной связи с правильным рас-

положением гидроксильных групп. Очищенные ферменты гликозилтрансферазы очень полезны для синтеза чистых химических соединений. Подобные синтетические методы представляют сегодня большой интерес, поскольку выделить из природного источника и получить в чистом виде определенный олигосахарид достаточно сложно. Для определения специфичности связывания можно использовать олигосахаридные микрочипы и лектины с флуоресцентной меткой (аналогично тому, как это описано в гл. 9 для ДНК-микрочипов).

Краткое содержание раздела 7.5 МЕТОДЫ АНАЛИЗА УГЛЕВОДОВ

- Для установления строения олигосахарида или полисахарида необходимо определить места разветвлений, последовательность моносахаридов в каждой ветви, конфигурацию каждого моносахаридного звена, а также положения гликозидных связей; эта задача по сложности намного превосходит анализ по-

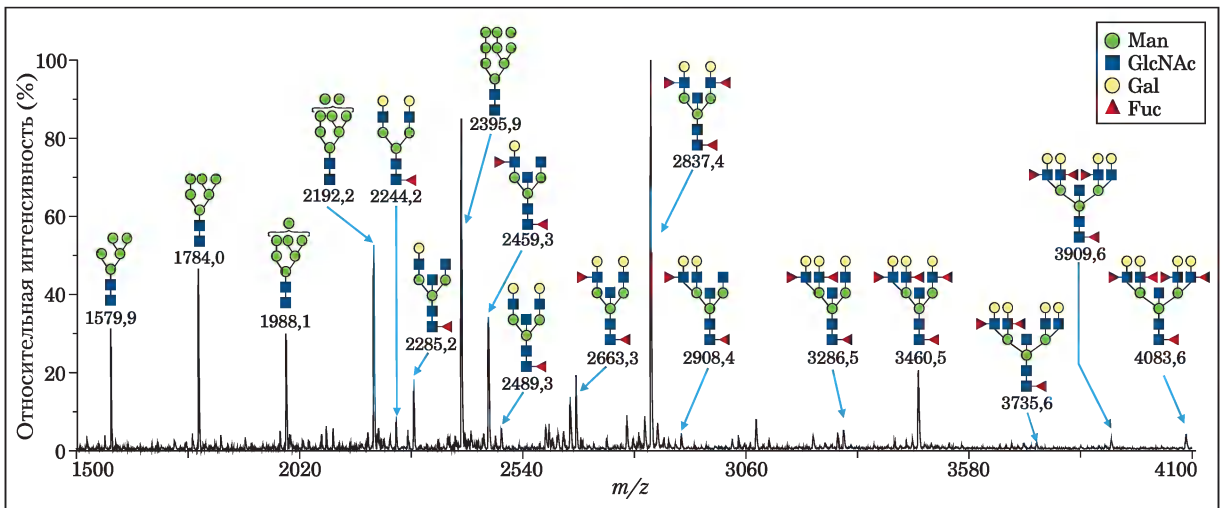


Рис. 7-37. Разделение и количественный анализ олигосахаридов из смеси гликопротеинов. В данном эксперименте смесь белков, выделенных из почечной ткани, обрабатывали таким образом, чтобы отделить олигосахаридные цепи, которые затем анализировали методом масс-спектрометрии (MALDI-MS). Каждому олигосахариду соответствует пик при определенной молекулярной массе, а площадь пика отражает количество этого олигосахарида в образце. Самый высокий пик соответствует олигосахариду с массой 28374, который состоит из 14 остатков. В том же образце обнаружены олигосахариды, содержащие 7 и 19 остатков.

следовательности белка или нуклеиновой кислоты.

- Строение олигосахаридов и полисахаридов обычно определяют, применяя комбинацию нескольких методов: специфический ферментативный гидролиз помогает определить стереохимию соединения и получить более мелкие фрагменты для последующего анализа; метилирование и кислотный гидролиз позволяют локализовать гликозидные связи; последовательное расщепление дает информацию о последовательности моносахаридов и конфигурации при аномерных атомах углерода.
- Масс-спектрометрия и ЯМР-спектрометрия высокого разрешения позволяют из небольшого количества образца извлечь большой объем информации о последовательности звеньев, конфигурации при аномерных и при других атомах углерода, а также положения гликозидных связей.
- Методы твердофазного синтеза позволяют получать олигосахариды заданного строения, что очень важно для изучения взаимодействий олигосахаридов с лектинами и, кроме того, может иметь важное клиническое значение.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

siglec 376	гликозаминогликан 359
альдоза 341	гликозидная связь 348
аномерный углерод 344	гликоконъюгат 339
аномеры 344	гликолипид 364
внеклеточный матрикс 359	гликопротеин 363
восстанавливающий конец 350	глипикан 364
восстанавливающий сахар 347	гликомика 369
гепарансульфат 361	дисахарид 339
гиалуроновая кислота 360	кетоза 341
гликан 352	крахмал 353
гликирование гемоглобина 349	лектин 372
гликоген 353	моносахарид 339
	мутаротация 344
	олигосахарид 339
	пираноза 344

полисахарид 340	протеогликан 363
полуацеталь 343	селектин 373
полукеталь 342	сиалoadгезин 376
проекционные формулы Фишера 341	синдекан 364
проекционные формулы Хеуорса 345	фураноза 344
	хондроитинсульфат 361
	эпимеры 343

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Основы химии углеводов

Collins, P.M. & Ferrier, R.J. (1995) *Monosaccharides: Their chemistry and Their Roles in Natural Products*, John Wiley & Sons, Chichester, England.

Подробное изложение для старшекурсников.

Lindhorst, T.K. (2003) *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2nd edn, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Morrison, R.T. & Boyd, R.N. (1992) *Organic Chemistry*, 6th edn, Benjamin Cummings, San Francisco.

Главы 34 и 35 посвящены структуре, стереохимии, номенклатуре и химическим реакциям углеводов.

Pérez, S. & Mulloy, B. (2005) Prospects for glycoinformatics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 517–524.

Хорошее введение в материалы о структуре, синтезе, химии и биологии углеводов, доступные в Интернете.

Yarki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., & Marth, J. (1999) *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Структура, биосинтез, метаболизм и функции гликозаминогликанов, протеогликанов, гликопротеинов и гликолипидов; изложение среднего уровня сложности с прекрасными иллюстрациями.

Гликозаминогликаны и протеогликаны

Bishop, J.R., Schuksz, M., & Esko, J.D. (2007) Heparan sulfate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030–1037.

Bülow, H.E. & Hobert, O. (2006) The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu. Rev. Cell Biol.* **22**, 375–407.

Обзор повышенного уровня сложности, посвященный роли дефектных гликолипидов в развитии заболеваний человека и использованию модельных организмов для изучения биологии гликозаминогликанов.

Esko, J.D. & Selleck, S.B. (2002) Order out of chaos: assembly of ligands binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 435–471.

Fears, C.Y. & Woods, A. (2006) The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol.* **25**, 443–456.

Обзор среднего уровня сложности.

Gama, C.I. & Hsieh-Wilson, L.C. (2005) Chemical approaches to deciphering the glycosaminoglycan code. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 609–619.

Обзор среднего уровня сложности об использовании химически синтезированных гликозминогликанов в изучении функций этих гликоконъюгатов.

Häker, U., Nybakken, K., & Perrimon, N. (2005) Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 530–541.

Обзор среднего уровня сложности о роли протеогликанов в доставке веществ.

Holt, C.E. & Dickson, B.J. (2005) Sugar codes for axons? *Neuron* **46**, 169–172.

Легкий в чтении обзор среднего уровня сложности о возможной роли гликозаминогликанов в регуляции роста аксонов при развитии нервной системы.

Izzo, R.V. (1998) Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 609–652.

Обзор с акцентом на последние генетические и молекулярно-биологические исследования матричных протеогликанов. Глубокое обсуждение соотношений структуры и функций некоторых наиболее важных протеогликанов, а также исследование новых аспектов их биологических свойств.

Roseman, S. (2001) Reflections on glycobiology. *J. Biol. Chem.* **276**, 41527–41542.

Обзор истории изучения углеводов и гликозаминогликанов в изложении одного из лидеров в данной области.

Sasisekharan, R., Raman, R., & Prabhakar, V. (2006) Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8**, 181–231.

Обзор повышенного уровня сложности, который включает методологию анализа гликозаминогликанов.

Гликопротеины

Freeze, H.H. & Aebi, M. (2005) Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 490–498.

Краткий обзор среднего уровня сложности о последствиях генетических нарушений в синтезе гликопротеинов.

Gahmberg, C.G. & Tolvanen, M. (1996) Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 308–311.

Imberty, A., Mitchell, E.P., & Wimmerová, M. (2005) Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 525–534.

Краткий обзор среднего уровня сложности.

Leroy, J.G. (2006) Congenital disorders of N-glycosylation including diseases associated with O- as well as N-glycosylation defects. *Pediatr. Res.* **60**, 643–656.

Обзор среднего уровня сложности о медицинских последствиях неправильного гликозилирования белков.

Mendonca-Previato, J.O., Todeschini, A.R., Heise, N., & Previato, J.O. (2005) Protozoan parasite-specific structures. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 499–505.

Краткий обзор среднего уровня сложности о строении гликопротеинов паразитов, связанных с олигосахаридами.

Varki, A. (2007) Glycan-based interactions involving invertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* **446**, 1023–1029.

Varki, A. & Angata, T. (2006) Siglecs — the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology* **16**, 1R–27R.

Обзор среднего уровня сложности о строении и биологии лектинов.

Weerapana, E. & Imperiali, B. (2006) Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* **16**, 91R–101R.

Обзор среднего уровня сложности о природном процессе гликозилирования белков.

Гликобиология и код сахаров

Angata, T. & Brinkman-Van der Linden, E. (2002) I-type lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 294–316.

Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., & Davies, G.J. (2004) Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. *Biochem. J.* **382**, 769–781.

Прекрасный обзор структурных основ специфичности белков, связанных с сахарами.

Boren, N., Normark, S., & Falk, P. (1994) Helicobacter pylori: molecular basis for host recognition and bacterial adherence. *Trends Microbiol.* **2**, 221–228.

О роли олигосахаридов в определении группы крови, а также об адгезии *H. pylori* к стенке желудка и возникновении язвы.

Brooks, S., Dwek, M.V., & Schumacher, U. (2002) *Functional and Molecular Glycobiology*, Garland Science, Oxford, UK.

Cornejo, C.J., Winn, R.K., & Harlan, J.M. (1997) Antiadhesion therapy. *Adv. Pharmacol.* **39**, 99–142.

Об использовании аналогов олигосахаридов для предотвращения адгезии патогена к хозяйской клетке-мишени.

Dahms, N.M. & Hancock, M.K. (2002) P-type lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 317–340.

Fukuda, M. (ed.). (2006) *Functional Glycomics*, Methods in Enzymology, Vol. 417, Academic Press, Inc., New York.

Fukuda, M. (ed.). (2006) *Glycobiology*, Methods in Enzymology, Vol. 415, Academic Press, Inc. New York.

Fukuda, M. (ed.). (2006) *Glycomics*, Methods in Enzymology, Vol. 416, Academic Press, Inc., New York.

Gabius, H.-J. (2000) Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. *Naturwissenschaften* **87**, 108–121.

Основы высокой информационной емкости олигосахаридов с важными примерами роли сахарного кода.

Gabius, H.-J., Andre, S., Kaltner, H., & Siebert, H.C. (2002) The sugar code: functional lectinomics. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 165–177.

Обзор причин довольно позднего осознания информационной роли олиго- и полисахаридов.

Ghosh, P., Dahms, N.M., & Kornfeld, S. (2003) Mannose-6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 202–212.

Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., Sweeney, M., & Proudfoot, A.E. (2005) Regulation of protein function by glycosaminoglycans—as exemplified by chemokines. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 385–410.

Hebert, D.N., Garman, S.C., & Molinari, M. (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality control tags. *Trends Cell Biol.* **15**, 364–370.

Обзор среднего уровня сложности.

Helenius, A. & Aebi, M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1019–1049.

Hooper, L.A., Manzella, S.M., & Baenziger, J.U. (1996) From legumes to leukocytes: biological roles for sulfated carbohydrates. *FASEB J.* **10**, 1137–1146.

Доказательства влияния сульфатированных олигосахаридов на время жизни пептидных гормонов, взаимодействие симбионтов в азотфиксирующих растениях и хоуминг лимфоцитов.

Iozzo, R.V. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J. Chem. Invest.* **108**, 165–167.

Введение к серии статей о гепарансульфате, опубликованных в этом номере; все их стоит прочесть.

Ito, Y., Hagihara, S., Matsuo, I., & Totani, K. (2005) Structural approaches to the study of oligosaccharides in glycoprotein quality control. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 481–489.

Kilpatrick, D.C. (2002) Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 187–197.

Введение к серии превосходных обзорных статей о лектинах и их биологической роли, опубликованных в этом номере.

Lederkremer, G.Z. & Glickman, M.H. (2005) A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 297–303.

Обзор среднего уровня сложности о роли гликозилирования белков в контроле качества работы эндоплазматического ретикулума.

Lütteke, T., Bohne-Lang, A., Loss, A., Goetz, T., Frank, M., & von der Lieth, C.-W. (2006) Glycosciences.de: an internet portal to support glycomics and glycobiology research. *Glycobiology* **16**, 71R–81R.

McEver, R.P., Moore, K.L., & Cummings, R.D. (1995) Leukocyte trafficking mediated by sele-carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* **270**, 11025–11028.

Краткий обзор, посвященный взаимодействию селективных с углеводными лигандами.

Reuter, G. & Gabius, H.-J. (1999) Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool? *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 368–422.

Прекрасный обзор химического разнообразия олиго- и полисахаридов, а также биологических процессов, зависящих от белково-углеводных взаимодействий.

Sharon, N. & Lis, H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**, 53R–62R.

Прекрасное введение в структуру и функции лектинов; среднего уровня сложности.

Taylor, M.E. & Drickamer, K. (2006) *Introduction to Glycobiology*, 2nd edn, Oxford University Press, Oxford

Weigel, P.H. & Yik, J.H. (2002) Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1572**, 341–363.

Методы анализа углеводов

Chaplin, M.F. & Kennedy, J.F. (eds) (1994) *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, 2nd edn, IRL Press, Oxford.

Очень полезное руководство для анализа всех типов сахаросодержащих молекул — моносахаридов, полисахаридов и гликозаминогликанов, гликопротеинов, протеогликанов и гликолипидов.

Dell, A. & Morris, H.R. (2001) Glycoprotein structure determination by mass spectroscopy. *Science* **291**, 2351–2356.

Краткий обзор методов MALDI масс-спектрометрии и tandemной масс-спектрометрии для определения структуры олигосахаридов.

Dwek, R.A., Edge, C.J., Harvey, D.J., & Wormald, M.R. (1993) Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 65–100.

Прекрасный обзор применений ЯМР, масс-спектрометрии и ферментативных реагентов для определения структуры олигосахаридов.

Fukuda, M. & Kobata, A. (1993) *Glycobiology: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.

Руководство по выделению и характеристике олигосахаридных частей гликопротеинов с использованием полного набора современных методов. Часть серии *IRL Press Practical Approach* на CD-ROM, Oxford University Press (www.oup-usa.org/acadsci/pasbooks.html).

Jay, A. (1996) The methylation reaction in carbohydrate analysis. *J. Carbohydr. Chem.* **15**, 897–923.

Подробное описание метода метилирования углеводов.

Lennarz, W.J. & Hart, G.W. (eds) (1994) *Guide to Techniques in Glycobiology, Methods in Enzymology*, Vol. 230, Academic Press, Inc., New York.

Практическое пособие по работе с олигосахаридами.

McCleary, B.V. & Matheson, N.K. (1986) Enzymatic analysis of polysaccharide structure. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **44**, 147–276.

Об использовании очищенных ферментов для анализа строения и стереохимии полисахаридов.

Paulson, J.C., Blixt, O., & Collins, B.E. (2006) Sweet spots in functional glycomics. *Nature Chem. Biol.* **2**, 238–248.

Обзор среднего уровня сложности о недавно открытых инструментах гликобиологии.

Rudd, P.M., Guile, G.R., Kuester, B., Harvey, D.J., Opdenakker, G., & Dwek, R.A. (1997) Oligosaccharide sequencing technology. *Nature* **388**, 205–207.

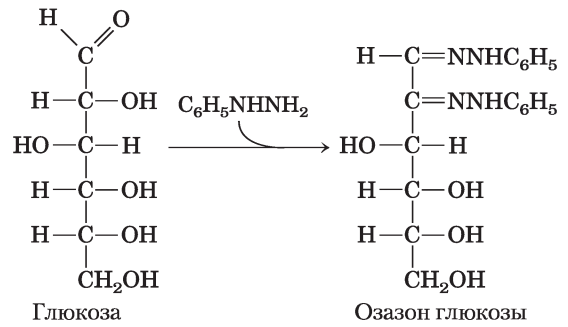
Seeberger, P.H. & Haase, W.-C. (2000) Solid-phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries. *Chem. Rev.* **100**, 4349–4393.

Вопросы и задачи

1. Сахароспирты. В сахароспиртах (производных моносахаридов) кислород карбонильной группы восстановлен до гидроксильной группы, например D-глицеральдегид восстановлен до глицерина. Однако последний не обозначают с помощью букв D или L. Объясните, почему.

2. Распознавание эпимеров. Пользуясь рис. 7-3, идентифицируйте по атомам C-2, C-3 и C-4 эпимеры: а) D-аллозы, б) D-гулозы и в) D-рибозы.

3. Точка плавления озазонов — производных моносахаридов. Многие углеводы реагируют с фенилгидразином ($C_6H_5NHNH_2$) с образованием ярко-желтых кристаллических производных, называемых озазонами:



Определить температуру плавления этих веществ нетрудно и это используют для идентификации каждого из них. Этот параметр ранее использовали при идентификации моносахаридов, пока не были разработаны высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и газожидкостная хроматография. Ниже приведены температуры плавления ($T_{пл}$) некоторых озазоновых производных альдоз.

Моносахарид	$T_{пл}$ моносахарида (°C)	$T_{пл}$ озазона (°C)
Глюкоза	146	205
Манноза	132	205
Галактоза	165–168	201
Талоза	128–130	201

Как видно из таблицы, определенные пары производных имеют одинаковые температуры плавления, хотя исходные моносахариды различались по этому параметру. Почему пары глюкоза–манноза и галактоза–талоза образуют озазоны с одинаковыми температурами плавления?

4. Взаимопревращения форм D-глюкозы. Один стереоизомер моносахарида, раствор которого вращает плоскость поляризации плоскополяризованного света влево (против часовой стрелки), называется левовращающим и обозначается (–); второй стереоизомер, который вращает плоскость поляризации плоскополяризованного света вправо (по часовой стрелке), называется правовращающим и обозначается (+). Эквимолярные смеси обеих форм не вращают плоскость поляризации проходящего плоскополяризованного света.

Оптическая активность стереоизомера количественно выражается в терминах *оптического вращения*, в градусах поворота плоскости поляризации плоскополяризованного света после прохождения его через раствор с заданной концентрацией и заданной толщиной слоя. *Удельное*

вращение ($[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}}$) оптически активного вещества определяется по формуле:

$$[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = \frac{\text{наблюдаемое оптическое вращение } (^\circ)}{\text{длина оптического пути (дм)} \times \text{концентрация (г/мл)}}$$

При этом следует указывать температуру раствора и длину волны падающего света (обычно это D-линия Na, т. е. 589 нм).

Свежеприготовленный раствор α -D-глюкозы имеет оптическое вращение $+112^\circ$. Со временем оптическое вращение этого раствора постепенно снижается и достигает равновесного значения $[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = +52,5^\circ$. Напротив, свежеприготовленный раствор β -D-глюкозы характеризуется оптическим вращением $+19^\circ$. Оптическое вращение этого раствора со временем увеличивается и достигает того же равновесного значения.

а) Нарисуйте проекционные формулы Хеуорса для α - и β -форм D-глюкозы. В чем состоит основное различие между ними?

б) Объясните, почему при хранении раствора α -формы величина оптического вращения уменьшается? Почему растворы α - и β -форм D-глюкозы в одинаковых концентрациях постепенно приходят к одинаковому значению оптического вращения?

в) Рассчитайте процентное содержание обеих форм D-глюкозы в состоянии равновесия.

5. Конфигурация и конформация. Какие связи в молекуле α -D-глюкозы должны быть разорваны, чтобы молекула приняла конфигурацию β -D-глюкозы? Какие связи нужно разорвать, чтобы превратить D-глюкозу в D-маннозу? Какие связи нужно разорвать, чтобы D-глюкоза из формы кресла перешла в другую конформацию?

6. Дезоксисахара. Обладает ли D-2-дезоксигалактоза теми же химическими свойствами, что D-2-дезоксиглюкоза? Объясните свой ответ.

7. Строение сахаров. Перечислите общие структурные черты и различия для каждой пары веществ: а) целлюлоза и гликоген; б) D-глюкоза и D-фруктоза; в) мальтоза и сахароза.

8. Восстанавливающие сахара. Изобразите структурную формулу α -D-глюкозил-(1 \rightarrow 6)-

D-маннозамина и укажите ту часть структуры, которая делает это вещество восстанавливающим сахаром.

9. Полуацетали и гликозидная связь. Объясните различие между полуацеталем и гликозидом.

10. Вкус меда. Фруктоза, входящая в состав меда, главным образом находится в виде β -D-пиранозы. Это один из самых сладких углеводов: сладость фруктозы в два раза превышает сладость глюкозы. Фруктоза в форме β -D-фуранозы гораздо менее сладкая. При нагревании меда его сладость постепенно снижается. Кроме того, кукурузный сироп с высоким содержанием фруктозы (коммерческий продукт, в котором большая часть глюкозы превращена во фруктозу) используют для придания сладости холодным, но не горячим напиткам. Какое химическое свойство фруктозы лежит в основе этих наблюдений?

11. Восстанавливающие дисахариды. Дисахарид, являющийся либо мальтозой, либо сахарозой, обрабатывают раствором Фелинга. Возникает красная окраска. Какой дисахарид был в растворе? Объясните свой ответ.



12. Использование глюкозооксидазы для определения уровня глюкозы крови.

Фермент глюкозооксидаза из плесневого гриба *Penicillium notatum* катализирует окисление β -D-глюкозы до D-глюконо- δ -лактона. Этот фермент катализирует реакцию только β -аномера, но не влияет на α -аномер. Несмотря на эту специфичность, реакция с глюкозооксидазой обычно используется в клинической практике для определения в крови общего содержания глюкозы, представляющей собой смесь α - и β -глюкозы. На чем основан этот метод анализа? Какие еще преимущества, кроме возможности определять низкие концентрации глюкозы, имеет глюкозооксидазный метод определения глюкозы по сравнению с методом Фелинга?

13. Инвертаза «инвертирует» сахарозу. При гидролизе сахарозы (удельное оптическое вращение $+66,5^\circ$) образуется эквимольная смесь D-глюкозы (удельное вращение $+52,5^\circ$) и D-фруктозы (удельное вращение -92°). (Определение оптического вращения см. в задаче 4.)

а) Предложите способ определения скорости гидролиза сахарозы в присутствии фермента из клеток выстилки тонкой кишки.

б) Объясните, почему эквимолярная смесь D-глюкозы и D-фруктозы в пищевой промышленности носит название инвертированного сахара?

в) Раствор сахарозы (10%) обрабатывают ферментом инвертазой (теперь этот фермент часто называют сахаразой) до полного гидролиза. Каким будет оптическое вращение раствора, если длина оптического пути (толщина ячейки) 10 см? (Небольшим влиянием фермента можно пренебречь.)

14. Производство шоколада с жидкой начинкой. Изготовление шоколада с жидкой начинкой — пример интересного применения ферментов в пищевой промышленности. Ароматизированная жидкая начинка представляет собой главным образом водный раствор сахаров, обогащенный для сладости фруктозой. Существует техническая проблема: для приготовления шоколадной оболочки твердую (или почти твердую) центральную часть нужно окружить горячим расплавленным шоколадом, но в готовом продукте под твердой оболочкой должно находиться жидкое содержимое. Предложите способ решения этой задачи. (*Подсказка.* Сахароза растворяется намного хуже, чем смесь глюкозы и фруктозы.)

15. Аномеры сахарозы. Лактоза существует в виде двух аномеров, а вот аномерных форм сахарозы обнаружено не было. Почему?

16. Гентиобиоза. Дисахарид гентиобиоза (D-Glc(β 1 \rightarrow 6)D-Glc) встречается в некоторых растительных гликозидах. Изобразите структуру этого соединения. Является ли это вещество восстанавливающим сахаром? Подвергается ли оно мутаротации?

17. Идентификация восстанавливающих сахаров. Является ли N-ацетил- β -D-глюкозамин (рис. 7–9) восстанавливающим сахаром? AD-глюконат? Дисахарид GlcN(α 1 \leftrightarrow α 1)Glc?

18. Расщепление целлюлозы. Целлюлоза могла бы служить широкодоступным и дешевым ис-

точником глюкозы, но человек не способен ее переваривать. Если бы вам предложили провести определенную процедуру, которая дала вам эту возможность, вы бы согласились? Объясните свой ответ.

19. Физические свойства целлюлозы и гликогена. Семена растений рода *Gossypium* (хлопчатник) окружает практически чистая целлюлоза, прочные волокна, нерастворимые в воде. В отличие от целлюлозы гликоген, выделенный из мышц или печени, легко диспергируется в горячей воде и образует мутный раствор — суспензию. Несмотря на различие физических свойств, оба этих вещества построены из остатков D-глюкозы, соединенных 1 \rightarrow 4-связями, и имеют приблизительно одинаковые молекулярные массы. Какие особенности строения этих веществ объясняют различия в их физических свойствах? Какое биологическое значение имеют эти особенности двух полисахаридов?

20. Размеры полисахаридов. Сравните между собой геометрические размеры молекул целлюлозы и амилозы, каждая из которых имеет молекулярную массу 200 000.


21. Скорость роста бамбука. Стебли тропической травы бамбука в оптимальных условиях могут расти феноменально быстро — до 0,3 м/сут. Если принять, что стебли почти полностью состоят из целлюлозы, волокна которой ориентированы в направлении роста, какое число остатков сахара в секунду присоединяется к растущей целлюлозной цепи в ферментативной реакции при такой скорости роста? Длина каждого остатка D-глюкозы в молекуле целлюлозы составляет ~0,5 нм.

22. Гликоген как хранилище энергии: как долго могут лететь промысловые птицы? Еще с древних времен было известно, что такие промысловые птицы, как куропатки, перепела и фазаны, очень быстро устают. Греческий историк Ксенофон писал: «Дрофу можно легко поймать, если ее внезапно вспугнуть, поскольку, подобно куропатке, она быстро устает и не может далеко улететь; ее мясо изумительно вкусно». Летательные мышцы промысловых птиц почти полностью обеспечиваются энергией (в форме АТФ) за счет

разложения глюкозо-1-фосфата (см. гл. 14), который образуется при расщеплении накопленного в мышцах гликогена под действием фермента гликогенфосфорилазы. Скорость синтеза АТФ ограничена скоростью распада гликогена. У птиц в состоянии паники скорость распада гликогена очень высока и составляет примерно 120 мкмоль/мин глюкозо-1-фосфата в расчете на 1 г сырой ткани. Считая, что летательные мышцы содержат около 35% гликогена по массе, вычислите, как долго может лететь промысловая птица. (Среднюю молекулярную массу остатка глюкозы в гликогене примите равной 162 г/моль.)

23. Относительная стабильность двух конформеров. Объясните, почему две структуры, изображенные на рис. 7-19, так сильно различаются по уровню энергии (стабильности). *Подсказка.* См. рис. 1-21.

24. Объем, занимаемый хондроитинсульфатом в растворе. Одной из важных функций хондроитинсульфата является смазка суставов, поскольку это вещество создает гелеобразную среду, препятствующую разрушению суставов от трения и ударов. Эта функция напрямую связана с известным свойством хондроитинсульфата: объем, занимаемый его молекулой в водном растворе, гораздо больше, чем в твердом состоянии. Почему так сильно увеличивается объем молекулы хондроитинсульфата в растворе?

 **25. Реакции гепарина.** Гепарин — гликозаминогликан, несущий высокий отрицательный заряд; в клинической практике это вещество используется в качестве антикоагулянта. Действие гепарина состоит в связывании некоторых белков плазмы крови, в том числе антитромбина III — ингибитора свертывания крови. Связывание гепарина с антитромбином III в соотношении 1:1 вызывает конформационные изменения в белке, которые значительно усиливают его ингибирующую способность. Какие аминокислотные остатки антитромбина III могут участвовать во взаимодействии с гепарином?

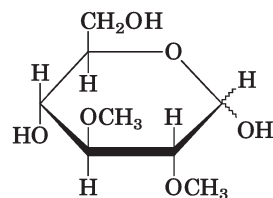
26. Трисахариды. Сколько трисахаридов можно составить из N-ацетилглюкозамин-4-сульфата (GlcNAc4S) и глюкуроновой кислоты (GlcA)? Изобразите структурные формулы 10 возможных трисахаридов.

27. Влияние сиаловой кислоты на электрофоретическую подвижность гликопротеинов. Предположим, что у вас есть четыре формы белка с одинаковой аминокислотной последовательностью, но разным числом (нуль, одна, две и три) олигосахаридных цепей, каждая из которых заканчивается одним остатком сиаловой кислоты. Изобразите результаты разделения смеси четырех гликопротеинов в полиакриламидном геле в присутствии SDS (см. рис. 3-18). Укажите, какому гликопротеину соответствует каждая полоса.

28. Информационное содержание олигосахаридов. Углеводная составляющая некоторых гликопротеинов может служить для клетки участком узнавания. Для выполнения этой функции олигосахариды гликопротеинов должны иметь возможность существовать в большом разнообразии форм. Какая цепочка может существовать в большем количестве вариантов: олигопептид, состоящий из пяти различных аминокислотных остатков, или олигосахарид, построенный из пяти различных моносахаридных звеньев? Объясните свой ответ.

29. Определение степени разветвленности амилопектина. Степень разветвленности (число гликозидных связей $\alpha 1 \rightarrow 6$) в амилопектине можно определить с помощью следующей процедуры. Навеску амилопектина подвергают полному метилированию, т. е. обрабатывают метилирующим агентом (метилюдиодом), замещающим все атомы водорода в гидроксильных группах сахара на метильные группы ($-\text{OH} \rightarrow -\text{OCH}_3$). Затем все гликозидные связи подвергают кислотному гидролизу и определяют количество 2,3-ди-О-метилглюкозы.

а) Объясните смысл такой процедуры определения числа $\alpha 1 \rightarrow 6$ связей в молекуле амилопектина. Что происходит с остатками глюкозы в неразветвленных участках амилопектина при метилировании и гидролизе?



2,3-Ди-О-метилглюкоза

б) В результате подобной обработки из 258 г амилопектина было получено 12,4 мг 2,3-ди-О-

метилглюкозы. Определите процентное содержание остатков глюкозы в амилопектине, участвующих в образовании $\alpha 1 \rightarrow 6$ связей. (Примите среднюю молекулярную массу остатка глюкозы в амилопектине равной 162 г/моль.)

30. Определение строения полисахарида. Полисахарид с неизвестной структурой был выделен, подвергнут полному метилированию и гидролизу. Анализ продуктов выявил наличие трех метилированных сахаров, присутствующих в соотношении 20 : 1 : 1. Этими сахарами были 2,3,4-три-О-метил-D-глюкоза, 2,4-ди-О-метил-D-глюкоза и 2,3,4,6-тетра-О-метил-D-глюкоза. Определите строение исходного полисахарида.

Анализ экспериментальных данных

31. Определение структуры антигенов групп крови АВ0. Система групп крови АВ0 у человека впервые была описана в 1901 г., а в 1924 г. было показано, что этот признак наследуется в виде единого генного локуса с тремя аллелями. В 1960 г. В. Т. Дж. Морган опубликовал работу, в которой суммировал все, что было известно об антигенах системы АВ0. На момент публикации полная структура антигенов А, В и 0 еще не была известна; данная статья является примером, иллюстрирующим формирование научного знания.

При попытке определить структуру неизвестного биологического материала любой ученый сталкивается с двумя большими проблемами. Во-первых, если вы не знаете, что это за вещество, как вы можете быть уверены, что оно чистое? Во-вторых, если вы не знаете, что это за вещество, как вы можете быть уверены, что процесс выделения и очистки не изменит его структуры? Для ответа на первый вопрос Морган применил несколько методов. Один метод, описанный в его статье, заключался в определении растворимости каждой из фракций белка, полученных при расщеплении образца. Растворимость не должна меняться от опыта к опыту. Производился также химический анализ, измерялись температуры плавления образцов.

а) На основании ваших знаний о химических методах анализа предположите, что Морган понимал под «определением растворимости фракций белка».

б) Почему получаемые при такой проверке аналитические значения для *чистого* вещества являются постоянными, а для *нечистого* — нет?

Для ответа на второй вопрос Морган измерял иммунологическую активность веществ, присутствующих в различных образцах.

в) Почему при этих исследованиях, особенно для ответа на второй вопрос, было важно, чтобы метод определения ферментативной активности был количественным (определение уровня активности), а не качественным (определение наличия или отсутствия активности)?

Структура антигенов групп крови представлена на рис. 10-15. В своей статье Морган перечислял некоторые свойства антигенов А, В и 0, которые были известны на тот момент:

1. Антиген В содержит больше галактозы, чем антигены А и 0.
2. Антиген А содержит больше аминокислот, чем антигены В и 0.
3. Соотношение содержания глюкозамина/галактозамина для антигена А равно 1,2, для антигена В 2,5.

г) Какие из заключений Моргана соответствуют современным данным о структуре антигенов А, В и 0?

д) Как вы объясните расхождения между предположениями Моргана и современными данными?

В более поздней работе Морган с сотрудниками использовал остроумный метод получения информации о структуре антигенов групп крови. Были обнаружены ферменты, специфическим образом разрушающие антигены. Однако они существовали только в виде сырых (неочищенных) препаратов, возможно, содержавших примеси других ферментов. Разрушение антигенов групп крови под действием этих ферментных препаратов можно было предотвратить путем добавления в реакционную смесь определенных сахаров, однако действие оказывали только те сахара, которые были найдены в структуре антигенов. Один ферментный препарат, выделенный из простейшего *Trichomonas foetus*, разрушал все три антигена, а его действие ингибировалось добавлением определенных сахаров. Результаты этих экспериментов сведены в представленной ниже таблице. Здесь показано,

какое количество антигенов групп крови остается неизменным после обработки ферментом *T. foetus* в присутствии сахаров.

Добавленные сахара	Неизмененный субстрат, %		
	А антиген	В антиген	0 антиген
Контроль (без сахара)	3	1	1
L-Фукоза	3	1	100
D-Фукоза	3	1	1
L-Галактоза	3	1	3
D-Галактоза	6	100	1
N-Ацетилглюкозамин	3	1	1
N-Ацетилгалактозамин	100	6	1

В случае антигена 0 из сравнения контрольного опыта и эксперимента с добавлением L-фукозы видно, что L-фукоза ингибировала разрушение антигена. Это пример ингибирования конечным продуктом, когда избыток продукта реакции сдвигает равновесие реакции, предотвращая дальнейшее разрушение субстрата.

е) Хотя антиген 0 содержит галактозу, N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин, ни один из этих сахаров не ингибировал разрушения антигена 0. На основании этих данных установите, являлся ли ферментный препарат из *T. foetus* эндо- или экзогликозидазой? (Эндогликозидазы расщепляют связи между остатками в середине цепи, экзогликозидазы отщепляют по одному остатку от конца цепи.) Объясните свои рассуждения.

ж) Фукоза также присутствует в антигенах А и В. На основании структуры этих антигенов объясните, почему фукоза не предотвращала их расщепления ферментным препаратом.

з) Какие из результатов, приведенных в пунктах (е) и (ж), соответствуют структурам, представленным на рис. 10-15? Объясните свои рассуждения.

Литература

Morgan, W.T. (1960) The Croonian Lecture: a contribution to human biochemical genetics; the chemical basis of blood-group specificity. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **151**, 308–347.

Такая изящная структура просто должна существовать.

Джеймс Уотсон, Двойная спираль, 1968*

8

Нуклеотиды и нуклеиновые кислоты

8.1. Основные понятия 391

8.2. Структура нуклеиновых кислот 400

8.3. Химия нуклеиновых кислот 412

8.4. Другие функции нуклеотидов 424

В клеточном метаболизме нуклеотиды выполняют множество функций. Они переносят энергию для биохимических превращений, играют роль важных химических посредников (вторичных мессенджеров) в ответе клеток на действие гормонов и других внеклеточных стимулов, входят как структурные элементы в состав кофакторов ферментов и метаболических интермедиатов. Наконец, из нуклеотидов построены нуклеиновые кислоты: дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) и рибонуклеиновая кислота (РНК), в которых хранится на молекулярном уровне генетическая информация. Структура каждого белка и, в конечном итоге, всех биомолекул и компонентов клетки закодирована в последовательности нуклеотидов молекул нуклеиновых кислот. Способность хранить и передавать генетическую информацию от одного поколения другому входит в число основных условий жизни.

Эта глава посвящена обзору химических свойств нуклеотидов и нуклеиновых кислот, обнаруженных в большинстве типов клеток; детальное описание функций нуклеиновых кислот дано в части III.

* Джеймс Д. Уотсон. Двойная спираль. — М.: Мир. — 1969.

8.1. Основные понятия

Нуклеотиды — блоки, из которых построены нуклеиновые кислоты. Аминокислотная последовательность каждого белка клетки и нуклеотидная последовательность каждой молекулы РНК определены последовательностью нуклеотидов соответствующего участка клеточной ДНК. Участок молекулы ДНК, содержащий необходимую информацию для синтеза биологического продукта с определенной функцией, будь это белок или РНК, называется **геном**. Обычно в клетке содержится много тысяч генов, и неудивительно, что молекулы ДНК очень велики. Хранение и передача биологической информации — единственная известная функция молекул ДНК.

У РНК более широкий набор функций; в клетке существует несколько разновидностей этих молекул. **Рибосомная РНК (рРНК)** входит в состав рибосом — сложных комплексов, где происходит синтез белков. **Матричная РНК (мРНК)** служит посредником, переносящим генетическую информацию от одного или нескольких генов к рибосоме, в которой могут синтезироваться соответствующие белки. **Транспортная РНК (тРНК)** точно преобразует информацию мРНК в соответствующую последовательность аминокислот. В дополнение к этим основным трем классам существует множество типов РНК со специальными функциями, что более подробно описано в части III.

В состав нуклеотидов и нуклеиновых кислот входят определенные основания и пентозы

Нуклеотиды состоят из трех характерных компонентов: (1) азотистого (азотсодержащего) основания, (2) сахара пентозы и (3) фосфата (рис. 8-1). Молекулу без фосфатной группы называют **нуклеозидом**. Азотистыми основаниями являются производные двух веществ: **пиримидина** и **пурина**. В типичных нуклеотидах основания и пентозы — гетероциклические соединения.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Атомы углерода и азота в исходных структурах пронумерованы общепринятым способом, чтобы облегчить наименование и идентификацию многочисленных производных. Нумерация атомов в пентозном кольце основана на правилах, приведенных в гл. 7, но в пентозах нуклеотидов к номерам атомов углерода добавляется еще знак штриха ('), чтобы отличать их от атомов азотистых оснований. ■

Основание нуклеотида ковалентно соединено (через атом N-1 пиримидинов и атом N-9 пуринов) N-β-гликозидной связью с 1'-угле-

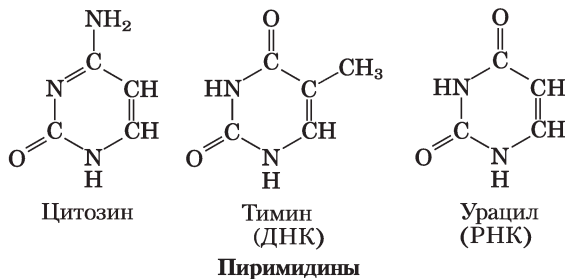
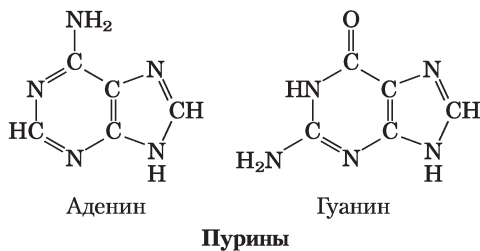


Рис. 8-2. Главные пуриновые и пиримидиновые основания нуклеиновых кислот. Некоторые названия отражают историю открытия этих соединений. Гуанин, например, впервые был выделен из гуано (птичьего помета), а тимин — из ткани тимуса.

родом пентозы. 5'-Углеродный атом пентозы, в свою очередь, соединяется эфирной связью с фосфатом. N-β-Гликозидная связь, как и O-гликозидная, образуется при удалении молекулы воды — гидроксил от пентозы и водород от основания (рис. 7-29).

В ДНК и РНК пуриновые основания одинаковые — **аденин (А)** и **гуанин (Г)**, а пиримидиновые разные: **цитозин (С)** в ДНК и РНК, но **тимин (Т)** в ДНК и **урацил (У)** в РНК. Изредка тимин встречается в РНК, а урацил в ДНК. Структурные формулы пяти главных оснований показаны на рис. 8-2, а номенклатура соответствующих им нуклеотидов и нуклеозидов представлена в табл. 8-1.

В состав нуклеиновых кислот входят пентозы двух типов. Повторяющиеся дезоксирибонуклеотидные единицы ДНК содержат 2'-дезоксид-Д-рибозу, а рибонуклеотидные единицы РНК — Д-рибозу. В нуклеотидах пентозы обоих типов находятся в β-фуранозной форме (замкнутое пятичленное кольцо). Как показано на рис. 8-3, атомы пентозного цикла расположены не в одной плоскости, а реализуют одну из складчатых конформаций.

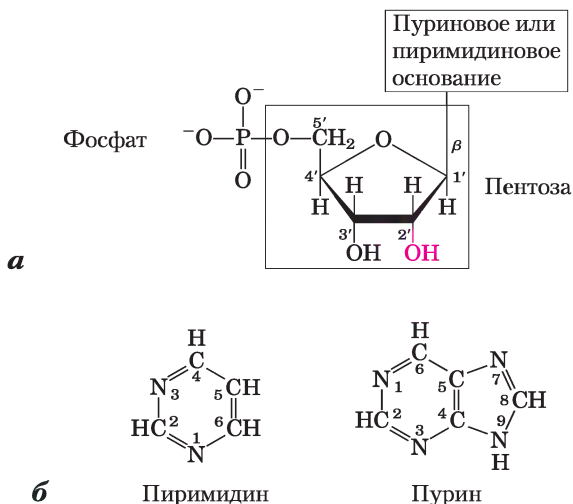


Рис. 8-1. Структурные формулы нуклеотидов. а) Принятая нумерация атомов пентозы в рибонуклеотиде. В дезоксирибонуклеотидах ОН-группа при 2'-углероде (обозначена красным) замещена на —Н. б) Принятая нумерация атомов в циклах пурина и пиримидина — соединений, которые служат основой для пуриновых и пиримидиновых оснований нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Таблица 8-1 Нуклеозиды и нуклеотиды нуклеиновых кислот

Основание	Нуклеозид	Нуклеотид	Нуклеиновая кислота
Пурины			
Аденин	Аденозин	Аденилат	РНК
	Дезоксиаденозин	Дезоксиаденилат	ДНК
Гуанин	Гуанозин	Гуанилат	РНК
	Дезоксигуанозин	Дезоксигуанилат	ДНК
Пиримидины			
Цитозин	Цитидин	Цитидилат	РНК
	Дезоксицитидин	Дезоксицитидилат	ДНК
Тимин	Тимидин или дезокситимидин	Тимидилат или дезокситимидилат	ДНК
Урацил	Уридин	Уридилат	РНК

Обратите внимание на то, что «нуклеозид» и «нуклеотид» — общие названия, включающие и рибо-, и дезоксирибоформы. Кроме того, рибонуклеозиды и рибонуклеотиды здесь просто названы нуклеозидами и нуклеотидами (например, рибоаденозин — здесь просто аденозин), а дезоксирибонуклеозиды и дезоксирибонуклеотиды — дезоксинуклеозидами и дезоксинуклеотидами (например, дезоксирибоаденозин — дезоксиаденозин). Приняты оба способа названий, но укороченные варианты используются чаще. Исключением является тимин; термин «риботимидин» используется только для тимина, включенного в РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Хотя между ДНК и РНК есть два основных отличия — разные пентозы и присутствие урацила в РНК и тимидина в ДНК — именно пентозы определяют тип нуклеиновой кислоты. Если нуклеиновая кислота содержит 2'-дезоксид-Д-рибозу, это ДНК, даже если в ней есть несколько остатков урацила. Аналогично, если нуклеиновая кислота содержит Д-рибозу, это РНК независимо от нуклеотидного состава. ■

На **рис. 8-4.** приведены структуры и названия четырех главных **дезоксирибонуклеотидов** (рибонуклеозид-5'-монофосфатов), структурных единиц ДНК, и четырех главных **рибонуклеотидов** (рибонуклеозид-5'-монофосфатов), структурных единиц РНК.

Хотя в состав нуклеотидов входят в основном главные пурины и пиримидины, и в ДНК, и в РНК встречаются некоторые минорные основа-

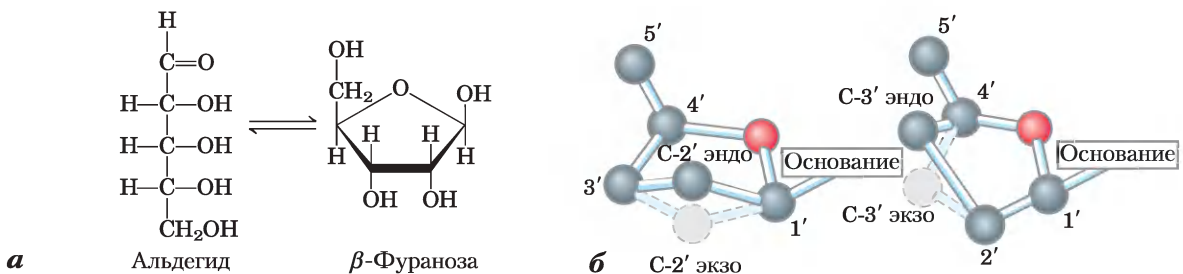
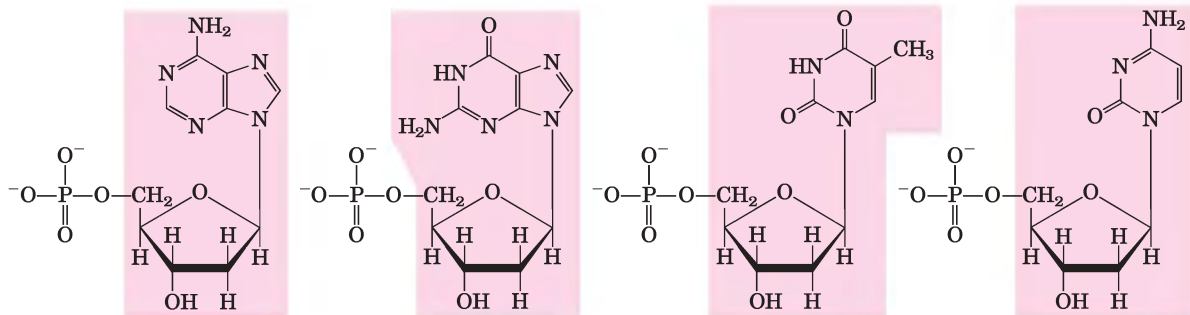


Рис. 8-3. Конформация рибозы. а) В растворе свободная рибоза может существовать в двух формах: цепочной (альдегидной) и циклической (β-фуранозной), которые находятся в равновесии. В РНК рибоза входит только в циклической форме, β-Д-рибофуранозы. Дезоксирибоза подвергается похожим изменениям в растворе, но в состав ДНК входит только в виде β-2'-дезоксид-Д-фуранозы. б) Рибофуранозный цикл, соединенный с нуклеотидом, может существовать в одной из четырех складчатых конформаций. Во всех структурах четыре из пяти атомов находятся в одной плоскости. Пятый атом (С-2' или С-3') располагается с той же (эндо-) или с другой (экзо-) стороны относительно С-5' атома.

a



Нуклеотиды: Дезоксиаденилат (дезоксиаденозин-5'-монофосфат)

Дезоксигуанилат (дезоксигуанозин-5'-монофосфат)

Дезокситимидаат (дезокситимидин-5'-монофосфат)

Дезоксицитидиат (дезоксицитидин-5'-монофосфат)

Обозначения: A, dA, dAMP

G, dG, dGMP

T, dT, dTMP

C, dC, dCMP

Нуклеозиды: Дезоксиаденозин

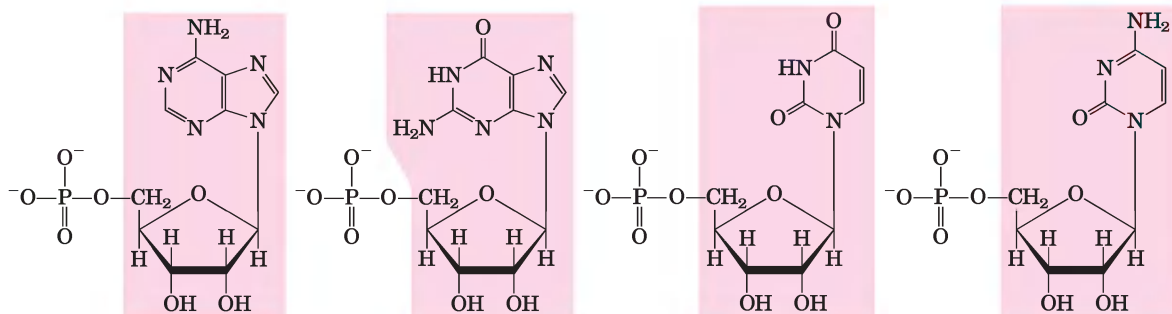
Дезоксигуанозин

Дезокситимидин

Дезоксицитидин

Дезоксирибонуклеотиды

б



Нуклеотиды: Аденилат (аденозин-5'-монофосфат)

Гуанилат (гуанозин-5'-монофосфат)

Уридилат (уридин-5'-монофосфат)

Цитидиат (цитидин-5'-монофосфат)

Обозначения: A, AMP

G, GMP

U, UMP

C, CMP

Нуклеозиды: Аденозин

Гуанозин

Уридин

Цитидин

Рибонуклеотиды

Рис. 8-4. Дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды нуклеиновых кислот. Все нуклеотиды показаны в свободной форме при pH = 7,0. Нуклеотиды ДНК (a) обычно обозначают как A, G, T и C, а иногда как dA, dG, dT и dC; а РНК — (б) A, G, U и C. В свободной форме нуклеотиды обычно обозначаются как dAMP, dGMP, dTMP и dCMP; а рибонуклеотиды — AMP, GMP, UMP и CMP. Для каждого нуклеотида после названия приведено (в круглых скобках) полное название. Везде подразумевается, что фосфат находится в 5'-положении. В каждой формуле нуклеозидная часть выделена выделена розовой плашкой. Здесь и следующих рисунках атомы углеродного кольца не показаны.

ния (рис. 8-5). В ДНК это чаще всего метилированные формы главных оснований, в некоторых вирусных ДНК определенные основания могут быть гидроксиметилированы или гликозилированы. Модифицированные или нестандартные основания в молекуле ДНК часто участвуют в регуляции или защите генетической информации. Различные минорные основания найдены также в РНК, особенно в тРНК (см. рис. 8-25 и 26-23).

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Номенклатура минорных оснований в некотором смысле запутанная. Как и главные основания, большинство из минорных имеют тривиальные названия, например на рис. 8-5 показана структура гипоксантина в составе нуклеозида инозина. При замещении атома в пуриновом или пиримидиновом цикле в названии нового соединения просто указывается заместитель и номер атома, к которому он присоеди-

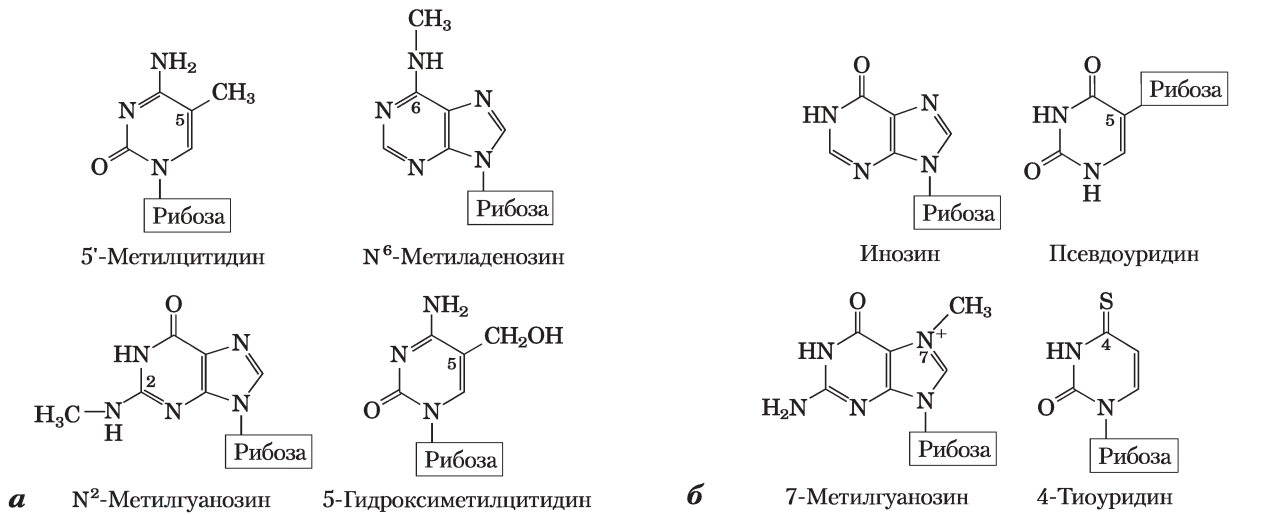


Рис. 8-5. Некоторые минорные пуриновые и пиримидиновые основания (редко встречающиеся в нуклеиновых кислотах) в виде нуклеозидов. *а*) Минорное основание — 5-метилцитидин встречается в ДНК животных и высших растений, N⁶-метиладенозин — в бактериальной ДНК, 5-гидроксиметилцитидин — в ДНК бактерии, инфицированной определенными бактериофагами. *б*) Некоторые минорные основания тРНК. В состав инозина входит основание гипоксантин. Обратите внимание на то, что псевдоуридин, как и уридин, содержит урацил; эти соединения различаются между собой местом соединения основания с рибозой — в урдине рибоза связана с N-1 атомом урацила, как и в других пиримидинсодержащих нуклеозидах; в псевдоуридине — с C-5 атомом.

нен, например 5-метилцитозин, 7-метилгуанин и 5-гидроксиметилцитозин (показаны в виде нуклеозидов на рис. 8-5). Элемент, к которому присоединен заместитель (N, C, O), не указывают. Номенклатура меняется, если замещенный атом находится вне циклической структуры; в таком случае указывается тип атома, к которому присоединен заместитель, а также номер атома в кольце в виде верхнего индекса. Атом азота аминогруппы, присоединенной к атому C-6 аденина, обозначают N⁶; аналогично, карбонильный кислород и азот аминогруппы, присоединенные к атомам C-6 и C-2 гуанина, — O⁶ и N² соответственно. Примерами могут служить N⁶-метиладенозин и N²-метилгуанозин (рис. 8-5). ■

Клетки также содержат нуклеотиды, в которых фосфатные группы соединены не с 5'-углеродом (рис. 8-6). Циклические 2',3'-рибонуклеозидмонофосфаты — это стабильные интермедиаты, которые можно выделить, а 3'-рибонуклеозидмонофосфаты образуются как конечные продукты при гидролизе РНК определенными рибонуклеа-

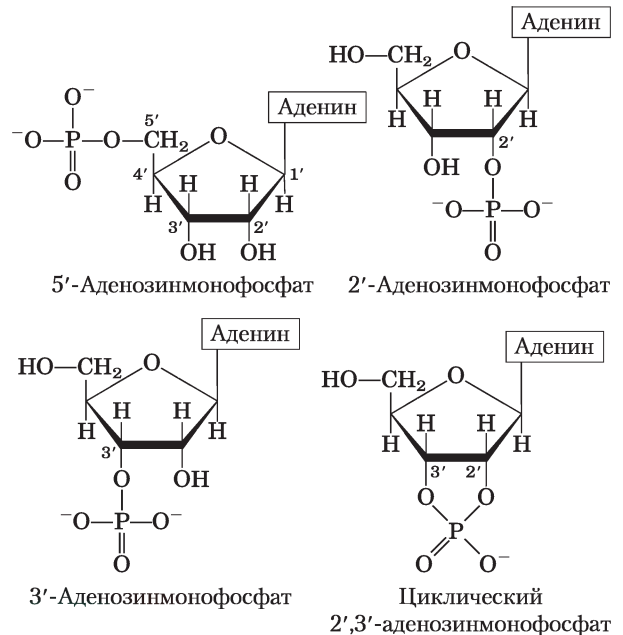


Рис. 8-6. Некоторые монофосфаты аденозина. 2'-Аденозинмонофосфат, 3'-аденозинмонофосфат и циклический 2',3'-аденозинмонофосфат образуются под действием специфических ферментов и при щелочном гидролизе РНК.

зами. Другие нуклеотиды, такие как циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (сАМФ) и циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат (сГМФ), рассматриваются в конце этой главы.

В нуклеиновых кислотах нуклеотиды последовательно связаны фосфодиэфирными связями

Нуклеотиды в ДНК и РНК ковалентно связаны между собой фосфодиэфирными мостиками, в которых 5'-фосфатная группа одного нуклеотида соединена с 3'-гидроксильной группой следующего нуклеотида с образованием **фосфодиэфирной связи** (рис. 8-7). Таким образом, ковалентный остов нуклеиновых кислот состоит из чередующихся остатков фосфата и пентозы, а азотистые основания можно рассматривать как боковые группы, присоединенные к остову регулярно через одинаковые интервалы. Остовы ДНК и РНК гидрофильны. Гидроксильные группы сахарных остатков образуют водородные связи с водой. У фосфатных групп $pK_a \approx 0$; они полностью диссоциированы при рН 7, их отрицательные заряды нейтрализуются в основном благодаря ионным взаимодействиям с белковыми молекулами, несущими положительные заряды, а также с ионами металлов и полиаминов.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Все фосфодиэфирные связи в ДНК и РНК направлены одинаково (рис. 8-7), благодаря чему каждая цепочка нуклеиновых кислот ориентирована и имеет разные 3'- и 5'-концы. По определению, у **5'-конца** отсутствует нуклеотид в 5'-положении, а у **3'-конца** отсутствует нуклеотид в 3'-положении. На одном или обоих концах могут находиться другие группы (чаще один или несколько фосфатов). Обозначение ориентации последовательности нуклеиновой кислоты от 5' к 3' относится к *концам* последовательности, а не к ориентации каждой отдельной фосфодиэфирной связи, соединяющей между собой нуклеотиды. ■

Фосфодиэфирные связи в молекулах ДНК и РНК подвергаются медленному неферментативному гидролизу. В пробирке РНК довольно быстро гидролизует в щелочной среде, а ДНК — нет; в этом процессе принимают участие 2'-гидроксильные группы РНК (которых нет в

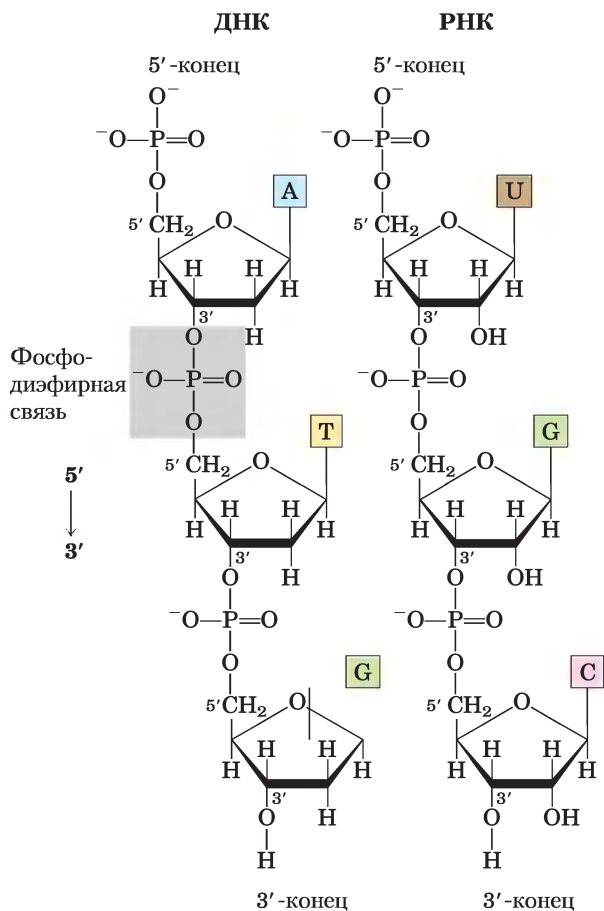


Рис. 8-7. Фосфодиэфирные связи в ковалентном остове ДНК и РНК. Фосфодиэфирные связи (одна из которых выделена в молекуле ДНК) последовательно соединяют нуклеотиды между собой. Остов из чередующихся пентозных и фосфатных групп обладает ярковыраженной полярностью и в ДНК, и в РНК. На 5'-конце макромолекулы отсутствует нуклеотид в 5'-положении, а на 3'-конце отсутствует нуклеотид в 3'-положении.

ДНК). Первыми продуктами действия щелочи на РНК являются циклические 2',3'-нуклеотидмонофосфаты, которые быстро гидролизуются с образованием смеси 2'-нуклеозид- и 3'-нуклеозидмонофосфатов (рис. 8-8).

Последовательность нуклеотидов в нуклеиновых кислотах можно представить схематически, как показано на следующей странице на примере участка ДНК из пяти нуклеотидов. Фосфатные группы изображены как (P), каждая дезоксирибоза обозначена вертикальной линией от атома C-1' сверху до атома C-5' вниз (но помните, что сахар в нуклеиновых кислотах всегда находится в замкну-

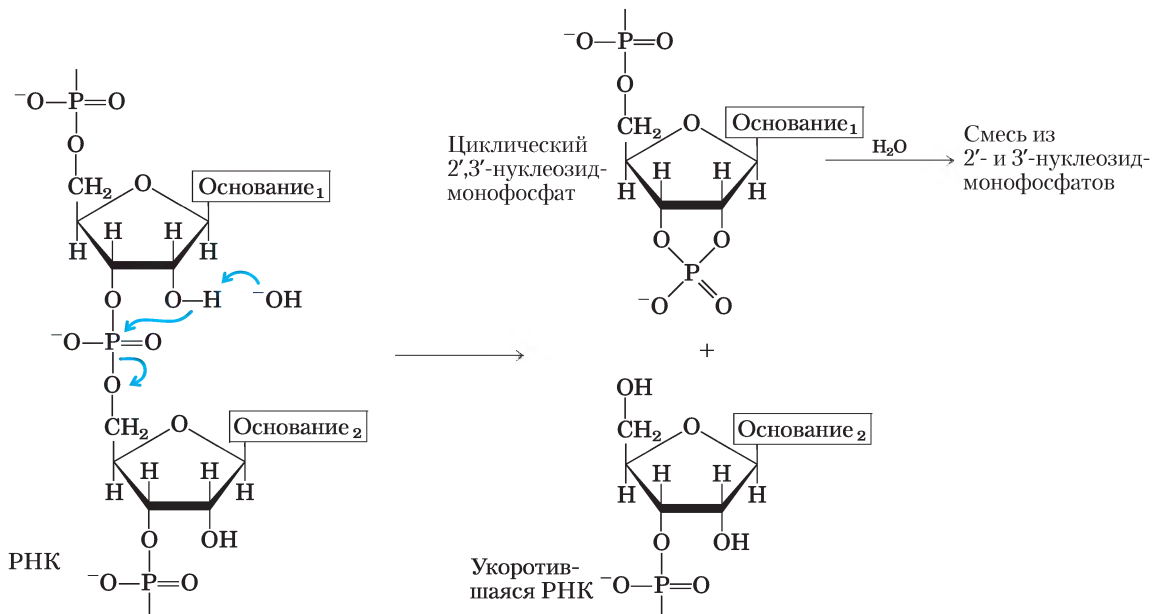
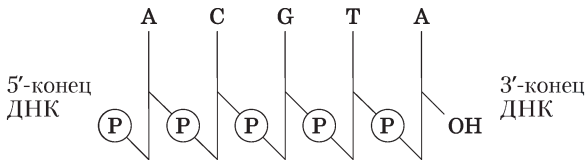


Рис. 8-8. Гидролиз РНК в щелочных условиях. 2'-Гидроксильная группа играет роль нуклеофила и вызывает смещение электронной плотности внутри молекулы. 2',3'-Циклический нуклеозидмонофосфат гидролизуется до смеси 2'- и 3'-нуклеозидмонофосфатов. ДНК, в которой отсутствует 2'-гидроксильная группа, в аналогичных условиях стабильна.

той β-фуранозной форме). Связи между нуклеотидами (которые проходят через P) изображены диагональю от середины (С-3') дезоксирибозы одного нуклеотида до низа (С-5') следующего.



Вот примеры других способов упрощенной записи этого фрагмента: $\text{pA-C-G-T-A}_{\text{OH}}$, pApCpGpTpA и pACGTA .

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Исторически сложилось так, что последовательность одной цепи нуклеиновой кислоты всегда начинают с 5'-конца и заканчивают 3'-концом слева направо в направлении $5' \rightarrow 3'$. ■

Короткие нуклеиновые кислоты называются **олигонуклеотидами**. Хотя представление о коротких последовательностях нуклеиновых кислот вводится весьма произвольно и строго не определено, но обычно биополимер, содержащий

менее 50 нуклеотидов, называются олигонуклеотидом. Нуклеиновые кислоты с более длинной нуклеотидной последовательностью называют **полинуклеотидами**.

Свойства азотистых оснований нуклеотидов влияют на трехмерную структуру нуклеиновых кислот

Свободные пиримидины и пурины обладают слабовыраженными основными свойствами и поэтому называются основаниями. Пурины и пиримидины, встречающиеся в ДНК и в РНК, представляют собой молекулы с сопряженными связями (рис. 8-2), что оказывает большое влияние на структуру, распределение электронов и спектр поглощения света нуклеиновыми кислотами. Делокализация электронов в циклических структурах придает многим связям характер полуторных. Вследствие этого молекулы пиримидинов плоские, пуринов — почти плоские (с одним изгибом). Свободные основания пуринов и пиримидинов могут существовать в двух или более таутомерных формах в зависимости от pH. Урацил, например, может существовать в трех формах: лактамной (диоксоформе), лактим-

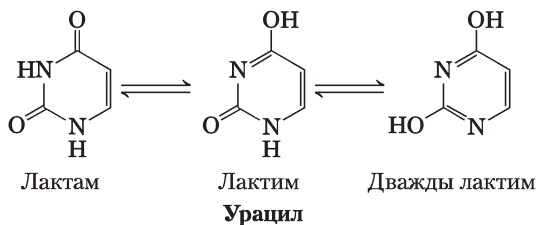


Рис. 8-9. Таутомерные формы урацила. Лактамная форма преобладает при pH 7,0; другие формы становятся более заметными при более низких pH. Другие пиримидины и пурины в свободном состоянии также могут существовать в различных таутомерных формах, но они реализуются реже.

ной (гидроксиоксоформе) и дважды лактимной (дигидроксиформе) (рис. 8-9). На рис. 8-2 показаны структурные формулы оснований для таутомерных форм, преобладающих при pH 7,0. Из-за существования резонансных структур все азотистые основания поглощают в УФ-области спектра, нуклеиновые кислоты характеризуются максимумом поглощения при ~260 нм (рис. 8-10).

Пуриновые и пиримидиновые основания гидрофобны и плохо растворимы в воде при близких к нейтральным значениям pH в клетке. В кислых и щелочных средах основания становятся заряженными, и их растворимость в воде увели-

чивается. Гидрофобные взаимодействия между соседними основаниями, плоскости колец которых расположены параллельно друг другу (как стопка монет), представляют собой один из двух самых важных типов нековалентных связей между основаниями в нуклеиновых кислотах. Связь между параллельными плоскими кольцами оснований (так называемые стекинг-взаимодействия, от англ. *stacking interactions*) осуществляется также за счет ван-дер-ваальсовых сил и диполь-дипольных взаимодействий. Упаковка оснований в виде стопки монет приводит к уменьшению их контактов с водой, а взаимодействия между параллельными основаниями очень важны для стабилизации трехмерной структуры нуклеиновых кислот, как будет описано ниже.

Наиболее важные функциональные группы пиримидинов и пуринов — это атомы азота кольца, карбонильные группы и аминогруппы, не входящие в цикл. Водородные связи между амино- и карбонильными группами служат вторым важнейшим типом взаимодействий между основаниями в нуклеиновых кислотах. Водородные связи между основаниями обеспечивают комплементарную ассоциацию между двумя (реже тремя или четырьмя) спиралями нуклеиновых кислот. Атомы, участвующие в образовании водородных связей, были определены Джеймсом Д. Уотсоном

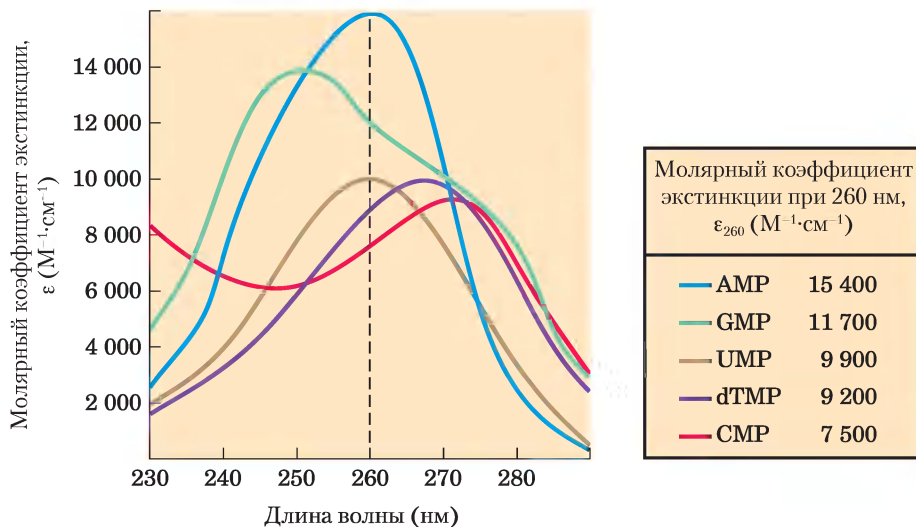


Рис. 8-10. Спектр поглощения нуклеотидов. Спектр показан как зависимость молярного коэффициента экстинкции от длины волны. Молярные коэффициенты экстинкции при 260 нм и pH 7,0 (ϵ_{260}) приведены в таблице. Спектры соответствующих рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов, как и нуклеозидов, практически идентичны. Поглощение смеси нуклеотидов измерено при длине волны 260 нм (показана пунктиром).

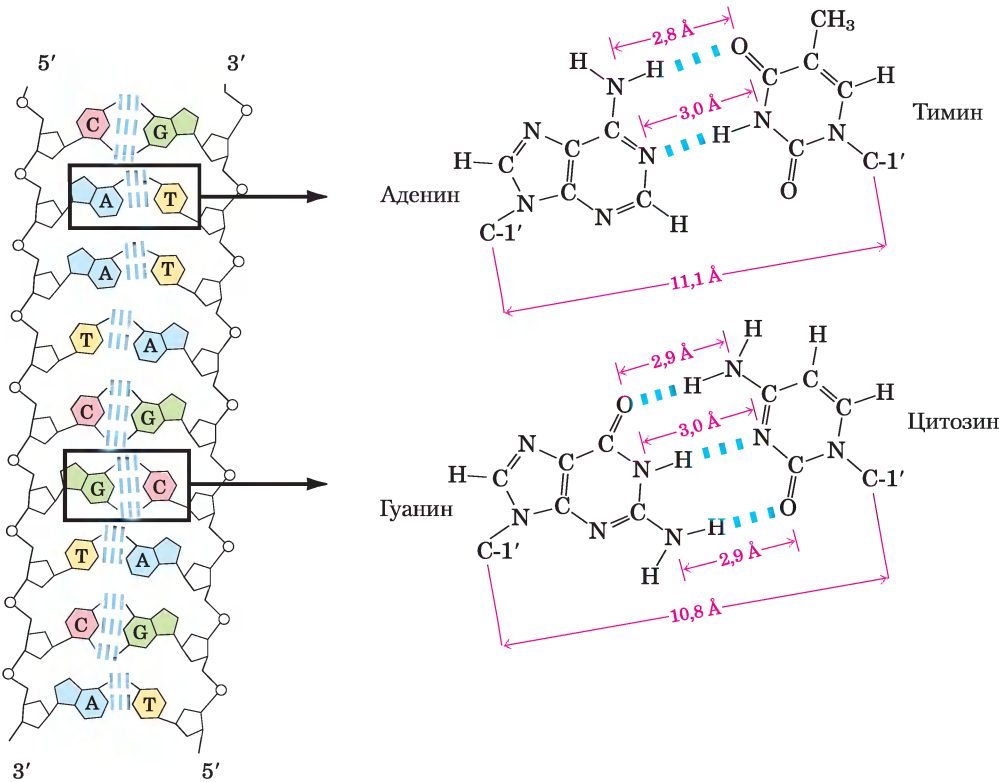


Рис. 8-11. Водородные связи между парами оснований в модели Уотсона и Крика. Здесь, как и везде, водородные связи изображены тремя голубыми черточками.

и Френсисом Криком в 1953 г. Они выяснили, что аденин (А) специфически связывается с тиминем (Т) или урацилом (U), а гуанин (G) — с цитозином (С) (рис. 8-11). Эти пары оснований преобладают в структуре двойных спиралей ДНК и РНК, такую организацию нуклеиновых кислот обеспечивают таутомеры, показанные на рис. 8-2. Именно спаривание этих оснований делает возможным стабильное воспроизводство,

т. е. удвоения генетической информации, как мы увидим позже в этой главе.

Краткое содержание раздела 8.1 ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

- Нуклеотиды содержат азотистые основания (пурины или пиримидины), пентозу и одну или несколько фосфатных групп. Нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры нуклеотидов, соединенных друг с другом фосфодиэфирными связями между 5'-гидроксильной группой пентозы одного нуклеотида и 3'-гидроксильной группой другого.

- Существуют два вида нуклеиновых кислот: РНК и ДНК. В РНК нуклеотиды содержат рибозу и пиримидиновые основания урацил и цитозин; в ДНК — 2'-дезоксирибозу и пиримидиновые основания тимин и цитозин. И в ДНК, и в РНК присутствуют пуриновые основания аденин и гуанин.



Джеймс Д. Уотсон



Френсис Крик, 1916–2004

8.2. Структура нуклеиновых кислот

Открытие структуры ДНК Уотсоном и Криком в 1953 г. стало важнейшим научным событием, которое положило начало развитию совершенно новых научных направлений и повлияло на уже существующие. В этом разделе основное внимание мы уделим структуре ДНК, ее открытию и некоторым современным уточнениям, дополняющим наши знания о ДНК. Здесь будет рассмотрено также строение молекулы РНК.

Как и при изучении строения белка (гл. 4), полезно описать строение нуклеиновых кислот исходя из иерархии организации ее структуры (первичная, вторичная, третичная). Первичная структура нуклеиновых кислот обусловлена ковалентными взаимодействиями и представляет собой последовательность нуклеотидов. Любая регулярная стабильная форма, образованная из некоторых или всех типов нуклеотидов, может быть названа вторичной структурой нуклеиновой кислоты. Все виды пространственной организации, которые рассмотрены далее в данной главе, являются элементами вторичной структуры. Сложные комплексы, образующиеся при сборке больших хромосом из эукариотического хроматина или бактериальных нуклеоидов, обычно рассматриваются как третичные структуры; это будет обсуждаться в гл. 24.

ДНК — двойная спираль, обеспечивающая хранение и передачу генетической информации

ДНК была впервые выделена и описана Фридрихом Мишером в 1868 г. Он назвал фосфатсодержащее вещество «нуклеином». Но до 1940-х гг., до работ Освальда Т. Эйвери, Колина Маклеода и Маклина Маккарти не было исчерпывающих доказательств, что ДНК несет генетическую информацию. Эйвери с коллегами обнаружили, что ДНК, выделенная из болезнетворного штамма бактерии *Streptococcus pneumoniae* (пневмококк; вызывает у человека тяжелую форму пневмонии), генетически трансформирует безопасный штамм этого организма в вирулентную форму. Был сделан вывод, что ДНК, выделенная из болезнетворного штамма, несет наследственный генетический признак вирулентности. В 1952 г. Альфред Д. Херши и

Марта Чэйз поставили эксперимент, в котором было изучено заражение бактериальной клетки вирусом (бактериофагом) с радиоактивно меченной ДНК или белком; в этом эксперименте было доказано, что именно ДНК, а не белок, несет наследственную информацию.

Важный ключ к разгадке строения ДНК был получен Эрвином Чаргаффом с сотрудниками еще в конце 1940-х гг. Они обнаружили, что четыре основания ДНК встречаются в разных соотношениях в молекулах ДНК разных организмов, но содержание определенных пар оснований практически одинаково. Эти данные, собранные у множества организмов, принадлежащих к разным видам, привели Чаргаффа к следующим выводам:

1. Содержание оснований в ДНК разных видов, как правило, различается.
2. Образцы ДНК, выделенные из разных тканей организмов одного вида, имеют одинаковый состав оснований.
3. Состав оснований ДНК конкретного вида не зависит от возраста, питания, окружающей среды.
4. Во всех клеточных ДНК независимо от вида, к которому принадлежит организм, число остатков аденозина равно числу остатков тимидина ($A = T$) и число остатков гуанозина равно числу остатков цитидина ($G = C$). Отсюда следует, что сумма пуриновых оснований равна сумме пиримидиновых оснований; т. е. $A + G = T + C$.

Эти количественные соотношения, называемые иногда «правилами Чаргаффа», были подтверждены многими исследователями. Эти правила помогли разгадать трехмерную структуру ДНК и пролили свет на то, как генетическая информация кодируется в ДНК и передается из поколения в поколение.

Розалинд Франклин и Морис Уилкинс использовали мощный метод рентгенографии (доп. 4-5) для исследования ДНК. В начале 1950-х гг. они показали, что при дифракции рентгеновских лучей на ДНК получается характерная дифракционная картина (рис. 8-12). Из рентгенограмм следовало, что молекулы ДНК представляют собой периодическую спиральную структуру с двумя периодами вдоль длинной



Розалинд Франклин,
1920–1958



Морис Уилкинс,
1916–2004

оси — один $3,4 \text{ \AA}$, другой — 34 \AA . После этого встала проблема подобрать такую трехмерную модель молекулы ДНК, чтобы она отвечала не только всем данным рентгеноструктурного анализа, но и правилу Чаргаффа о равенстве числа оснований в парах $A = T$ и $G = C$ и другим известным химическим свойствам ДНК.

Джеймс Уотсон и Френсис Крик, проанализировав уже полученную информацию о ДНК, смогли понять, как она построена. В 1953 г. Уотсон и Крик представили трехмерную модель структуры ДНК, которая удовлетворяла всем известным данным. Она состояла из двух спиральных нуклеотидных цепей, закрученных вокруг одной оси, при этом образованная двойная спираль была правозакрученной (см. доп. 4-1 для объяснения способов определения право- или левозакрученной спиральной структуры). Гидрофильные остовы чередующихся дезокси-

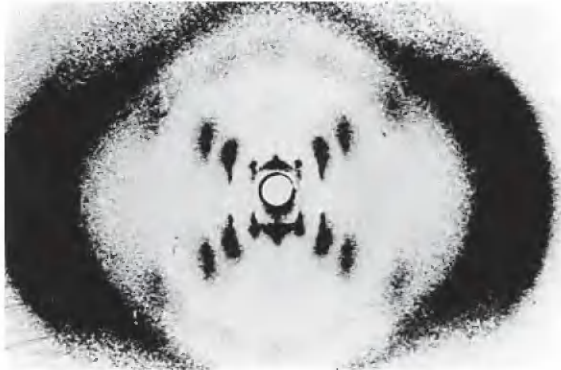


Рис. 8-12. Рентгенограмма ДНК. Пятна образуют крест в центре спиральной структуры. Темные полосы по бокам образованы повторяющимися основаниями.

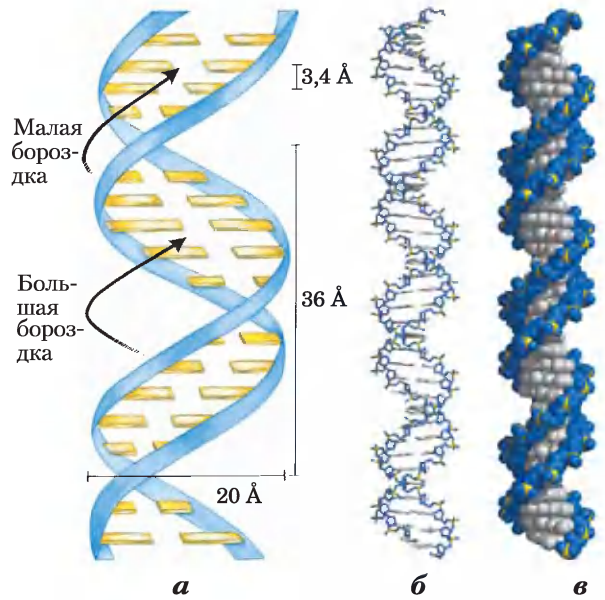


Рис. 8-13. Модель структуры ДНК, предложенная Уотсоном и Криком. Исходная модель, предложенная Уотсоном и Криком, содержала 10 пар оснований, имела длину 34 \AA (или $3,4 \text{ нм}$) на один оборот спирали; последующие измерения показали, что на один оборот приходится 10,5 пар оснований, и он имеет длину 36 \AA (или $3,6 \text{ нм}$). а) Схема с размерами спирали. б) Модель из палочек (остов ДНК) и стопки оснований. в) Объемная модель.

рибозных и фосфатных групп находятся снаружи двойной спирали и по соседству с водным окружением. Циклы фуранозы каждой дезоксирибозы соответствуют *эндо*-конформации $C-2'$. Пуриновые и пиримидиновые основания обеих цепей уложены очень близко друг к другу внутри двойной спирали. Это гидрофобные, почти плоские структуры, перпендикулярные главной оси ДНК. При таком соединении цепей на поверхности парной структуры образуются **большая и малая бороздки** (рис. 8-13). Каждое нуклеотидное основание одной цепи образует пару с основанием другой цепи в одной плоскости. Уотсон и Крик показали, что связанные водородными связями пары оснований G с C и A с T , показанные на рис. 8-11, наилучшим образом согласуются с их структурой и объясняют правило Чаргаффа о том, что в любой молекуле ДНК $G=C$ и $A=T$. Надо подчеркнуть, что между G и C могут образоваться три водородные связи, что

обозначается как $G \equiv C$, а между А и Т только две водородные связи, $A = T$. Это одна из причин, что разделение спаренных цепей ДНК затруднено, если число пар $G \equiv C$ больше, чем $A = T$. Образование пар между другими основаниями в той или иной степени дестабилизирует двойную спираль.

Уотсон и Крик, конструируя свою модель, должны были принять одну из двух гипотез — **параллельны** или **антипараллельны** цепи в двойной спирали ДНК, т. е. направлены ли их 5',3'-фосфоэфирные связи в одну сторону или в разные стороны. Модель с антипараллельной ориентацией цепей была более убедительной, и в более поздних работах с ДНК-полимеразой (гл. 25) были получены экспериментальные доказательства того, что цепи действительно антипараллельны, а в дальнейшем это полностью подтвердилось рентгеноструктурным анализом.

Для учета периодичности, обнаруженной при рентгеноструктурном анализе цепей ДНК, Уотсон и Крик создали молекулярную модель, в которой соседние основания одной цепи внутри двойной спирали находились бы на расстоянии 3,4 Å друг от друга; и вся эта структура повторялась через 34 Å, совершая полный виток двойной спирали за 10 пар оснований. В водном растворе структура ДНК слегка отличается от той, что была получена для кристалла, и содержит 10,5 пар оснований на каждый полный виток спирали (рис. 8-13).

Как показано на **рис. 8-14**, две антипараллельные полинуклеотидные цепи ДНК не идентичны ни по последовательности пар оснований, ни по составу. Но они **комплементарны** друг другу. Если в одной цепи стоит аденин, напротив него в другой цепи находится тимин; аналогично, гуанину в одной цепи соответствует цитозин в другой.

ДНК представляет собой двойную спираль (дуплекс), которая удерживается двумя силами: водородными связями между парами оснований (рис. 8-11) и стекинговыми взаимодействиями между параллельными плоскостями соседних оснований. Комплементарность между цепями ДНК обеспечивается образованием водородных связей между парами оснований. Главный вклад в стабильность двойной спирали вносят стекинговые взаимодействия между соседними основаниями одной цепи, которые менее специфичны

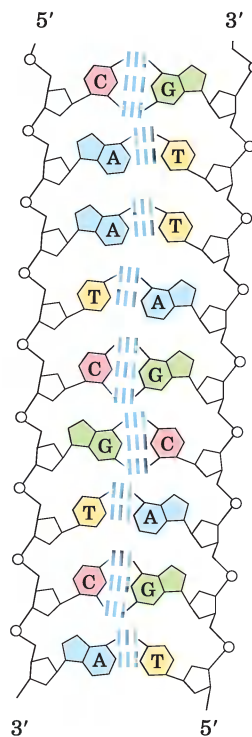


Рис. 8-14. Комплементарность цепей в двойной спирали ДНК. Комплементарность антипараллельных цепей ДНК следует из правил образования пар, предположенных Уотсоном и Криком. Комплементарные антипараллельные цепи отличаются друг от друга по составу: если левая цепь имеет формулу $A_3T_2G_1C_3$, то правая — $A_2T_3G_3C_1$. Они также различаются и по последовательности, если читать ее в направлении $5' \rightarrow 3'$. Обратите внимание, что число парных оснований в двойной спирали совпадает, а именно $A = T$ и $G = C$.

в отношении типа оснований. Модель двойной спирали ДНК подтверждена многочисленными химическими и биологическими данными. Более того, пользуясь этой моделью можно объяснить также механизм передачи генетической информации. В этой модели существенная роль принадлежит комплементарности двух цепей ДНК. Уотсон и Крик сумели выявить эту особенность логически, еще до того, как были получены подтверждающие данные, что (1) их структура может быть реплицирована при разделении двух цепей и (2) комплементарная цепь каждой спирали построена. Так как нуклеотиды каждой новой цепи подбираются в последовательности, удовлетворяющей правилу спаривания оснований, каждая существующая цепь играет роль шаблона

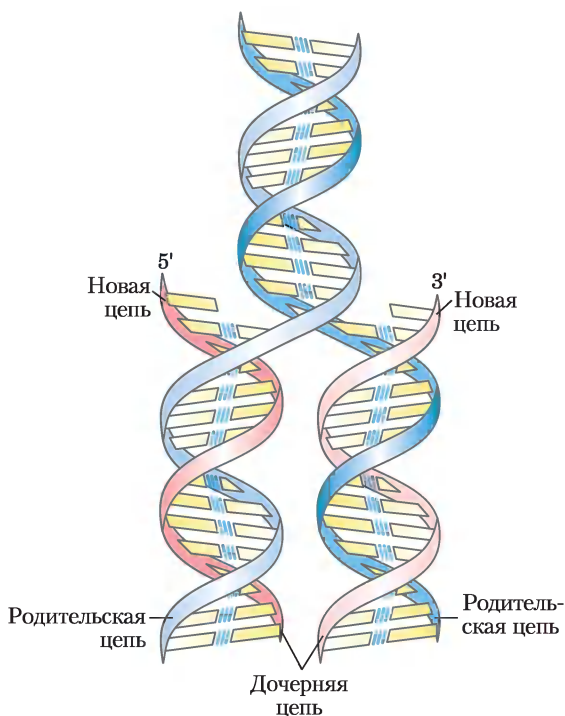


Рис. 8-15. Репликация цепей ДНК, предположенная Уотсоном и Криком. Уже существующие («родительские») цепи ДНК расходятся, и каждая из них служит шаблоном для синтеза комплементарной («дочерней») цепи (красная).

для синтеза комплементарной цепи (рис. 8-15). В дальнейшем это было подтверждено экспериментально, что вызвало революционные изменения нашего понимания биологической наследственности.

Пример 8-1 ПАРЫ ОСНОВАНИЙ В ДНК

В образцах ДНК, выделенных из двух неизвестных видов бактерий (X и Y), на аденин приходится 32 и 17% общего содержания оснований соответственно. Каково относительное содержание гуанина, тимина и цитозина в этих двух образцах ДНК? Какие допущения вам пришлось сделать, чтобы ответить на этот вопрос? Один из видов бактерий был выделен из горячего источника с температурой 64 °С. Какой из двух видов наиболее вероятно выделен из горячего источника? Объясните свой ответ.

Решение. В любой двойной спирали ДНК $A=T$ и $G=C$. ДНК из бактерии X содержит 32% А, следовательно, там 32% Т. В сумме это дает 64%, следовательно, содержание пар $G=C$ составляет оставшиеся 36%: 18% приходится на G и 18% на C. В образце из бактерии Y содержится 17% А, следовательно, 17% Т, в сумме 34%. Оставшиеся 66% распределяются поровну между G и C (по 33%). Данный расчет сделан на основании предположения, что обе молекулы ДНК двухцепочечные.

Чем выше содержание пар $G+C$ в молекуле ДНК, тем выше температура плавления ДНК. Более вероятно, что из горячего источника была выделена бактерия Y, в которой содержится больше пар $G+C$. Ее ДНК имеет более высокую температуру плавления и, следовательно, обладает большей стабильностью при температуре воды в горячем источнике.

ДНК может иметь разные пространственные конфигурации

ДНК — отнюдь не отлитая в камне статуя! Возможно вращение вокруг некоторых связей сахарофосфатного (фосфодезоксирибозного) скелета и из-за теплового движения сгибание, растягивание и распаривание (плавление) цепей. Для клеточной ДНК было найдено довольно много структур, отличающихся от модели ДНК Уотсона и Крика, причем многие из них могут играть важную роль в метаболизме ДНК. В структурных вариациях обычно сохранены ключевые свойства ДНК, определенные Уотсоном и Криком: комплементарность цепей и их антипараллельность и выполнение требования $A=T$ и $G=C$.

Изменение пространственной структуры ДНК обусловлено тремя возможными причинами: разными конформациями дезоксирибозы, вращением вокруг соседних связей фосфодезоксирибозного остова (рис. 8-16, а) и свободным вращением вокруг С-1'-N-гликозидной связи (рис. 8-16, б). Из-за стерических ограничений пуриновые основания в нуклеотидах могут находиться только в двух стабильных конформациях относительно дезоксирибозы, их называют *син*- и *анти*- (рис. 8-16, б). Пиримидиновые основания из-за стерического взаимодействия между сахаром и карбонильным кислородом при атоме С-2

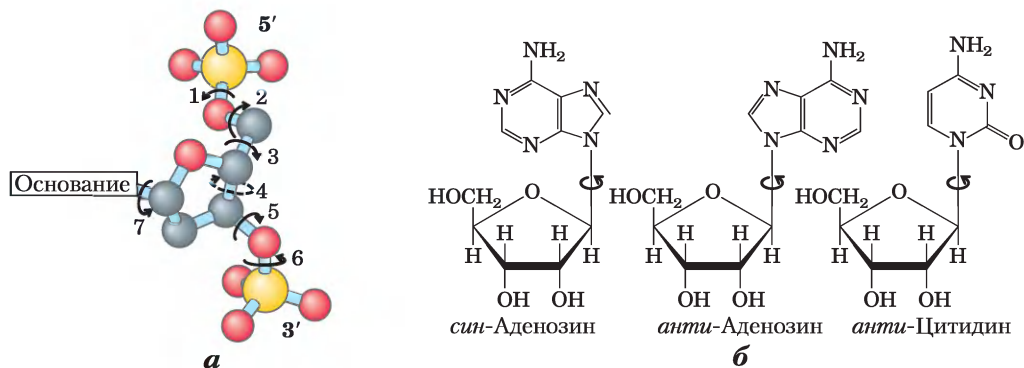
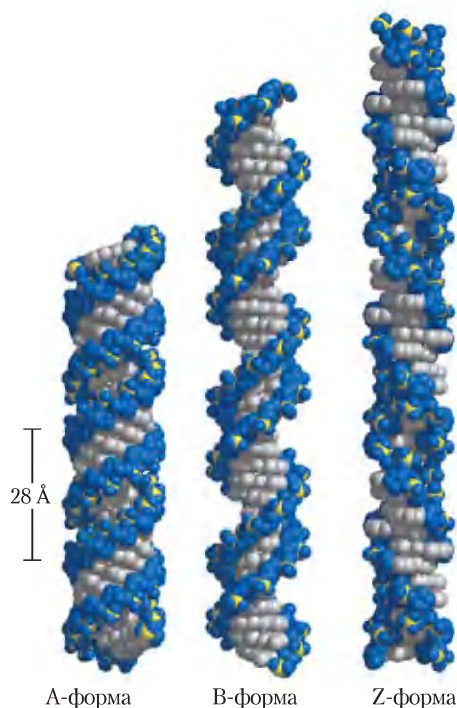


Рис. 8-16. Вариации в структуре ДНК. а) Конформация нуклеотидов в ДНК зависит от возможности вращения вокруг семи связей. Шесть связей позволяют свободное вращение. При четвертой связи поворот ограничен некоторым углом и определяет конформацию пентозного цикла: один из атомов в этом пятичленном фуранозном кольце находится вне плоскости, на которой лежат другие четыре атома. В результате для фуранозы возможна *эндо*- или *экзо*-конформация в зависимости от того, находится ли этот пятый (С-5') выступающий атом фуранозы по ту или другую сторону плоской структуры из четырех атомов (рис. 8-3, б). б) Для пуриновых нуклеотидов возможны только две стерических конформации относительно рибозы — *анти*- или *син*-. Пиримидины встречаются обычно в *анти*-конформации.



А-форма	В-форма	Z-форма	
Направление спирали	Правозакрученная	Правозакрученная	Левозакрученная
Диаметр	~26 Å	~20 Å	~18 Å
Число пар оснований на один виток спирали	11	10,5	12
Расстояние между соседними парами оснований	2,6 Å	3,4 Å	3,7 Å
Угол плоскости оснований к оси спирали	20°	6°	7°
Конформация сахара	C-3' <i>эндо</i> -	C-2' <i>эндо</i> -	C-2' <i>эндо</i> - для пиримидинов; C-3' <i>эндо</i> - для пуринов
Конформация гликозидной связи	<i>анти</i> -	<i>анти</i> -	<i>анти</i> - для пиримидинов; <i>син</i> - для пуринов

Рис. 8-17. Сравнение А-, В- и Z-форм ДНК. Каждая молекула, показанная здесь, содержит 36 пар оснований. Основания показаны серым, атомы фосфора желтым, а рибоза и атомы кислорода фосфатных групп — синим. В последующих главах синий цвет используется при изображении цепей ДНК. В таблице суммированы свойства трех форм ДНК.

пиримидинового цикла могут существовать только в одной *анти*-конформации.

Пространственная организация ДНК, предложенная Уотсоном и Криком, называется **В-формой ДНК** (В-ДНК). Образование В-формы наиболее вероятно для случайной последовательности молекулы ДНК при физиологических условиях, таким образом, В-ДНК служит стандартом, на который ссылаются при исследовании любых свойств ДНК. Две другие формы также хорошо охарактеризованы в виде кристаллического вещества, и называются **А-** и **З-формами**. Эти три конформации ДНК показаны на **рис. 8-17** с кратким перечислением их основных свойств. А-форма образуется в средах с низким содержанием воды. А-ДНК представляет собой правозакрученную двойную спираль, на один виток которой приходится 11 пар оснований (в отличие от 10,5 в В-ДНК). В А-ДНК плоскости спаренных оснований находятся под углом приблизительно 20° к оси спирали. В результате этих структурных изменений углубляется большая бороздка, а малая бороздка становится почти незаметной. Реагенты, используемые при кристаллизации ДНК, как правило, дегидрируют ее, поэтому большинство коротких молекул ДНК кристаллизуются именно в А-форме.

З-форма ДНК очень сильно отличается от В-структуры; самое главное, что это — левозакрученная спираль. На один ее виток приходится 12 оснований, сама молекула более узкая и удлиненная. Остов ДНК принимает зигзагообразную форму. Левозакрученную спираль образует чаще всего вполне определенная последовательность нуклеотидов. Наиболее известные примеры таких последовательностей — это чередующиеся пиримидиновые и пуриновые основания, особенно чередующиеся остатки С и G или 5-метил-С и G. При образовании левозакрученной спирали в З-ДНК пуриновые остатки принимают *син*-конформацию и чередуются с пиримидинами в *анти*-конформации. Большая бороздка в З-ДНК едва заметна, а малая бороздка узкая и глубокая.

Встречается ли А-ДНК в клетках — неизвестно, но по некоторым данным, короткие фрагменты З-ДНК могут быть и у прокариот, и у эукариот. Эти фрагменты З-ДНК могут играть роль (пока неизвестно какую) в регуляции экспрессии некоторых генов или в генетической рекомбинации.

Определенные последовательности ДНК могут иметь необычное пространственное строение

В больших хромосомах был найден ряд других вариантов трехмерной организации ДНК, форма которых зависит от последовательности. Это может влиять на функцию и метаболизм сегментов ДНК, которые находятся в непосредственной близости друг от друга. Например, изгибы встречаются в спиральных ДНК везде, где расположены подряд четыре или более остатков аденозина. Шесть аденозинов подряд образуют изгиб под углом $\sim 18^\circ$. Такое искривление последовательности может играть важную роль при связывании ДНК с некоторыми белками.

Достаточно распространенный тип последовательности ДНК — так называемый **палиндром**. Палиндром — это слово, фраза или предложение, которое звучит одинаково при чтении слева направо и справа налево, например: ПОТОП; МЁД ЖДЁМ. Этот термин применяется для обозначения участков ДНК с **инвертированными повторами** последовательностей оснований, которые имеют симметрию второго порядка для двух цепей ДНК (**рис. 8-18**). Такая последовательность комплементарна самой себе, и поэтому может образовывать структуры

Палиндром



Зеркальный повтор



Рис. 8-18. Палиндромы и зеркальные повторы. Палиндромами называют последовательности в двойной спирали нуклеиновых кислот с симметрией второго порядка. При повороте вокруг горизонтальной оси на угол 180° , а затем вокруг вертикальной оси тоже на 180° такая структура накладывается сама на себя, что показано цветными стрелками. Зеркальные повторы — симметричные повторы в каждой цепи. Для того чтобы наложить эту структуру саму на себя, достаточно всего лишь один раз повернуть последовательность вокруг вертикальной оси на 180° .

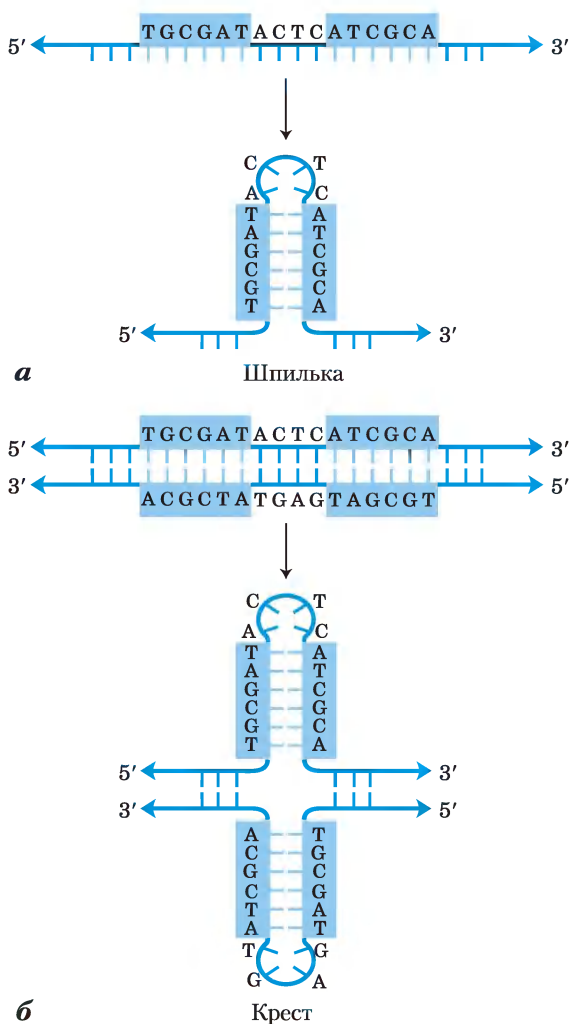


Рис. 8-19. Шпильки и кресты. Палиндромные последовательности ДНК (или РНК) могут по-разному сворачиваться с образованием пар между основаниями внутри одной цепи. *а*) Когда в образовании структуры участвует только одна цепь ДНК (или РНК), полученная форма называется шпилькой. *б*) Крестом называется вторичная структура из палиндромных последовательностей двух нитей ДНК. Синим закрашены асимметричные участки ДНК, комплементарные последовательностям в той же или в другой цепи.

типа **шпильки** или **креста** (две симметричные шпильки) (рис. 8-19). Если инвертированные повторы встречаются в одной цепи ДНК, такие последовательности называются **зеркальными повторами**. Зеркальные повторы не являются комплементарными последовательностями для

самих себя и не способны образовывать шпильки и крестообразные структуры. Последовательности такого типа найдены практически во всех больших молекулах ДНК и могут включать от нескольких оснований до нескольких тысяч оснований. Частота, с которой палиндромы в виде крестообразных структур встречаются в клетке, неизвестна; такие формы организации ДНК были найдены *in vivo* у *Escherichia coli*. Отдельные цепи самокомплементарных последовательностей ДНК (или РНК) выделяются из раствора в виде сложных структур, содержащих много шпилек.

Необычные структуры ДНК состоят из трех или более цепей ДНК. Нуклеотиды, участвующие в образовании уотсон-криковских пар (рис. 8-11), могут иметь дополнительные водородные связи, особенно с функциональными группами, расположенными в большой бороздке. Например, остаток цитидина (протонированный) может связываться с остатком гуанозина с образованием нуклеотидной пары $G \equiv C$, а тимидин с аденозином — пары $A = T$ (рис. 8-20). Атомы N^7 , O^6 и N^6 пуринов могут участвовать в образовании водородных связей в триплексе ДНК; эти атомы иногда называются **хугстиновскими положениями**, а не-уотсон-криковские пары — **хугстиновскими парами**, по имени Карста Хугстина, который в 1963 г. первым указал на возможность существования такого необычного способа образования пар. Благодаря этим нетипичным водородным связям формируется **трехцепочечная ДНК** (триплекс). Трехцепочечные фрагменты, показанные на рис. 8-20 (*а*, *б*), наиболее стабильны при низких значениях рН, так как для образования триплета $G \equiv C \cdot C^+$ необходимо протонирование цитозина. В трехцепочечной структуре pK_a цитозина $>7,5$, что отличается от обычного значения 4,2. Эти структуры более охотно формируются в длинных последовательностях, содержащих только пиримидины или пурины в одной из цепей. Некоторые трехцепочечные структуры ДНК содержат две пиримидиновые цепи и одну пуриновую; другие состоят из двух пуриновых и одной пиримидиновой.

Четыре цепи ДНК также могут связываться друг с другом, образуя четырехцепочечную структуру (тетраплекс или квадруплекс), но это происходит только между последовательностями

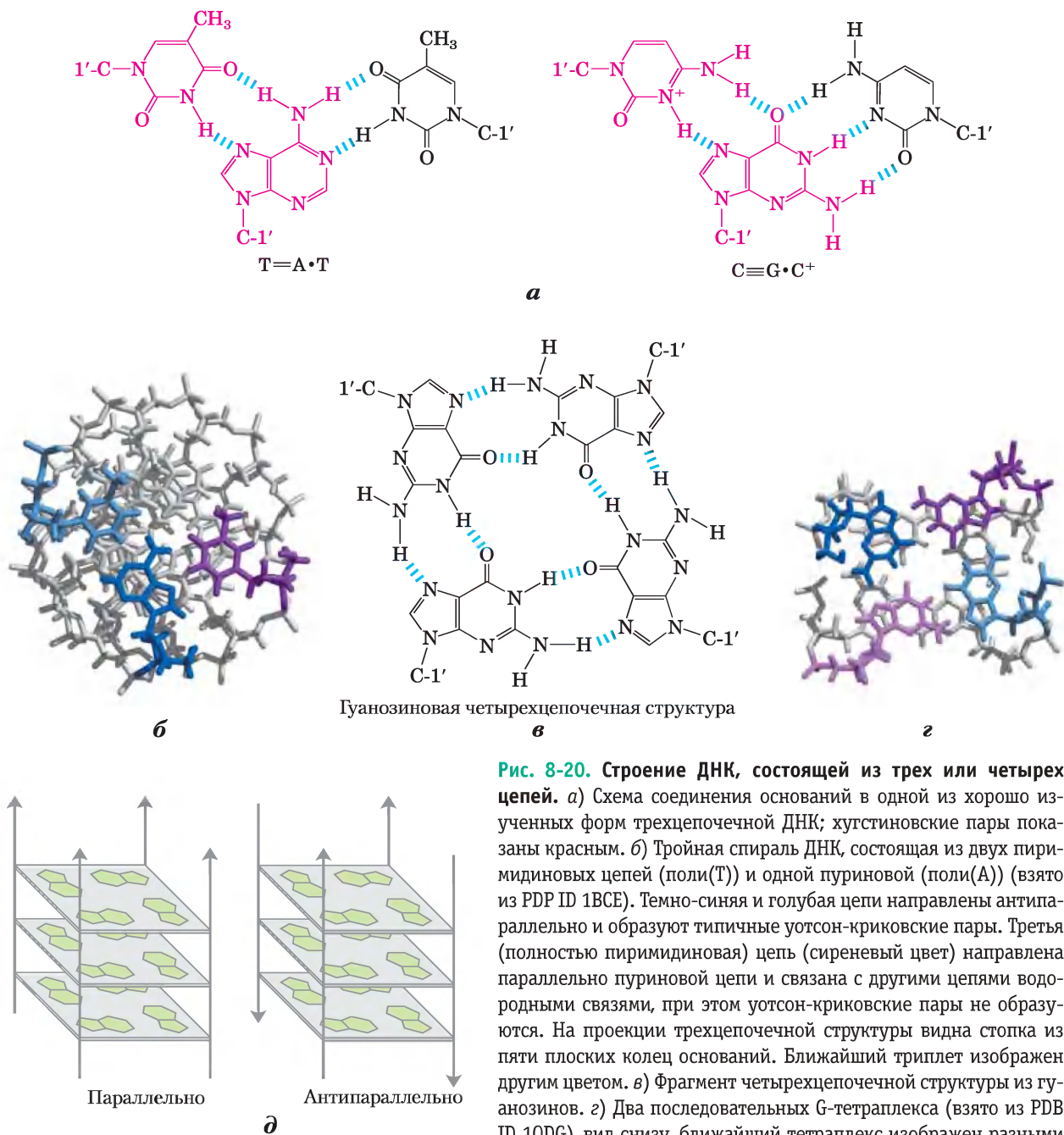


Рис. 8-20. Структура ДНК, состоящей из трех или четырех цепей. а) Схема соединения оснований в одной из хорошо изученных форм трехцепочечной ДНК; хугстиновские пары показаны красным. б) Тройная спираль ДНК, состоящая из двух пиримидиновых цепей (поли(T)) и одной пуриновой (поли(A)) (взято из PDB ID 1BCE). Темно-синяя и голубая цепи направлены антипараллельно и образуют типичные уотсон-криковские пары. Третья (полностью пиримидиновая) цепь (сиреневый цвет) направлена параллельно пуриновой цепи и связана с другими цепями водородными связями, при этом уотсон-криковские пары не образуются. На проекции трехцепочечной структуры видна стопка из пяти плоских колец оснований. Ближайший триплет изображен другим цветом. в) Фрагмент четырехцепочечной структуры из гуанозинов. г) Два последовательных G-тетраплекса (взято из PDB ID 1QDG), вид снизу, ближайший тетраплекс изображен разными цветами. д) Возможные варианты ориентации цепей, содержащих G-тетраплексы.

ми с высоким содержанием гуанозиновых остатков (рис. 8-20, в, г). Гуанозиновая четырехцепочечная структура, или **G-тетраплекс**, довольно стабильна в широком диапазоне условий. Ориентация цепей в тетраплексе может быть различной, как показано на рис. 8-20, д.

В ДНК живой клетки сайты узнавания многих специфических ДНК-связывающих белков (гл. 28) представлены палиндромами, а полипиримидины и полипурины, которые могут образовывать тройные спирали или даже H-ДНК, найдены в регионах, участвующих в регуляции

или экспрессии некоторых эукариотических генов. В принципе, цепи ДНК, синтезированные, чтобы связываться с образованием трехцепочечной ДНК, могут нарушить экспрессию генов. Это важно отметить в связи с большим коммерческим интересом к возможности регуляции экспрессии генов для решения задач в области медицины и сельского хозяйства.

Матричные РНК содержат информацию о полипептидных цепях

После краткого рассмотрения структуры ДНК обратимся к обсуждению той генетической информации, которую она содержит. РНК — второй важный тип нуклеиновых кислот в клетке; они выполняют множество функций. В процессе экспрессии генов молекулы РНК участвуют в качестве посредников, использующих информацию, закодированную в ДНК, для формирования аминокислотной последовательности функционального белка.

Учитывая то, что ДНК эукариот находится в ядре, а синтез белка происходит в цитоплазме на рибосомах, генетическую информацию из ядра в цитоплазму должны переносить не ДНК, а другие молекулы. С начала 1950-х гг. РНК рассматривалась в качестве наиболее вероятного кандидата: эти молекулы были найдены и в ядре, и в цитоплазме, а увеличение синтеза белка сопровождалось увеличением содержания РНК в цитоплазме и увеличением скорости ее оборота. Эти и другие сведения привели некоторых исследователей к мысли о том, что РНК переносит генетическую информацию от ДНК к аппарату для биосинтеза белка — рибосоме. В 1961 г. Франсуа Жакоб и Жак Моно предложили целостную (и по существу верную) картину этого процесса и ввели термин матричная РНК (мРНК; от англ. *messenger RNA*) для тех клеточных РНК, которые переносят генетическую информацию от ДНК к рибосомам, где становятся шаблоном, по которому собирается специфическая последовательность аминокислот. Хотя длина мРНК разных генов может сильно варьировать, для конкретного гена она имеет определенный размер. Процесс образования мРНК по матрице ДНК называется **транскрипцией**.

У бактерий и архей одна молекула мРНК может кодировать одну или несколько полипептидных цепей. Если в мРНК закодирован

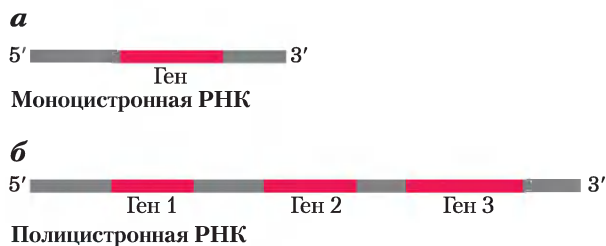


Рис. 8-21. Бактериальные мРНК. На схеме показаны моноцистронная (а) и полицистронная (б) молекулы мРНК бактерий. Красные сегменты представляют участок РНК, в котором закодирован отдельный ген; серые сегменты — некодирующие участки РНК. В полицистронном транскрипте между некодирующими участками РНК находятся три гена.

только один полипептид, то она называется **моноцистронной**; если два или более разных полипептидов — **полицистронной**. У эукариот большинство мРНК моноцистронные. (Для простоты цистрон здесь называется геном. Термин сам по себе имеет исторические корни в генетике, и его формальное определение выходит за рамки данного изложения.) Минимальная длина мРНК определяется длиной полипептидной цепи, которую она кодирует. Например, для синтеза полипептидной цепи из 100 аминокислотных остатков необходима кодирующая последовательность РНК длиной, по крайней мере, 300 нуклеотидов, так как каждая аминокислота кодируется триплетом нуклеотидов (эта и другие детали синтеза белка рассматриваются в гл. 27). Однако длина мРНК, синтезируемой по матрице ДНК, всегда немного больше, чем необходимо просто для кодирования полипептидной последовательности (или последовательностей). Дополнительная, некодирующая, последовательность РНК содержит участки, которые регулируют белковый синтез. На **рис. 8-21** изображена общая структура бактериальной мРНК.

Многие молекулы РНК имеют очень сложную трехмерную структуру

Матричная РНК — это только один из нескольких классов клеточной РНК. Транспортная РНК служит вспомогательной молекулой при синтезе белка; она ковалентно связана с аминокислотой и при этом может комплементарно соединяться с



Рис. 8-22. Типичный правозакрученный фрагмент одноцепочечной РНК. Основания показаны серым цветом, атомы фосфора желтые, остатки рибозы и атомы кислорода фосфатных групп зеленые. В последующих главах зеленый цвет используется для цепей РНК, а синий — для цепей ДНК.

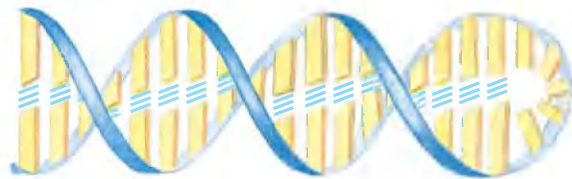
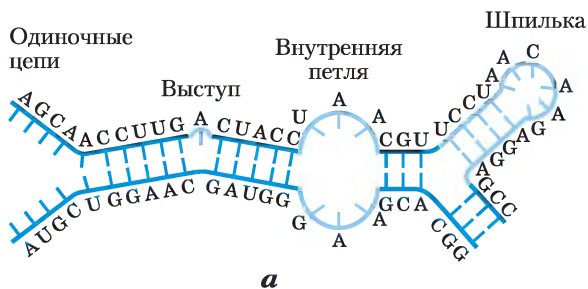
матричной РНК таким образом, чтобы аминокислота встраивалась в растущую цепь в правильном порядке. Рибосомная РНК функционирует в качестве одного из компонентов рибосом. Существует также много разных типов РНК со специализированными функциями, в том числе такие, которые обладают ферментативной активностью (рибозимы).

Все типы РНК детально рассмотрены в гл. 26. Молекулы РНК выполняют много разных функций, часто сразу несколько, и это отражает тот факт, что их пространственное строение более разнообразно, чем у молекулы ДНК.

Продуктом транскрипции ДНК всегда является одноцепочечная РНК. Единственная нить принимает, как правило, правозакрученную конформацию благодаря стекинговым взаимодействиям между основаниями (рис. 8-22), причем они намного сильнее между двумя пуринами, чем между пурином и пиримидином или между двумя пиримидинами. Пурин-пуриновое взаи-

модействие настолько сильно, что пиримидин, разделяющий два пурина, может быть вытеснен из области между пуринами для обеспечения контакта между пуринами. Любая комплементарная самой себе последовательность формирует более сложные структуры. РНК может образовывать пары оснований либо с ДНК, либо с РНК. Пары практически такие же, как и в ДНК: G связывается с C, A с U (или с редко встречающимся остатком T в некоторых РНК). Единственное различие состоит в том, что возможно также образование пары между остатками G и U — это необычно для ДНК, но довольно распространено в РНК (см. рис. 8-24). Спаренные цепи в двуцепочечных РНК или РНК-ДНК антипараллельны, как и в ДНК.

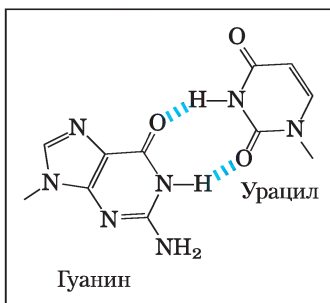
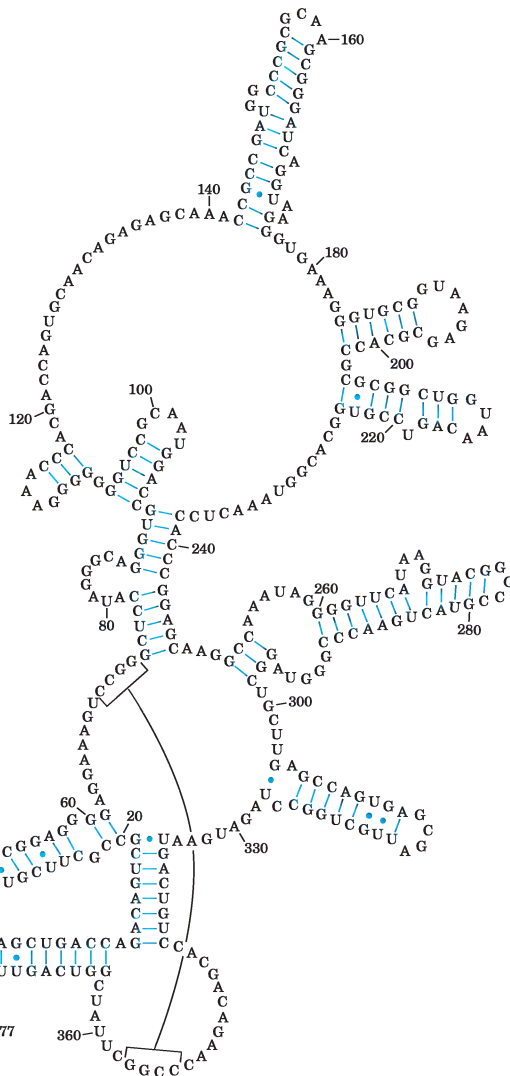
РНК не имеет регулярной вторичной структуры, которая могла бы служить стандартом, как двойная спираль ДНК. Трехмерные структуры многих РНК, как и белков, сложны и уникальны. Слабые взаимодействия, особенно стекинговые, играют огромную роль в стабилизации структур РНК, как и в ДНК. В участках, где присутствуют комплементарные последовательности, преобладающая двухнитевая структура — это А-форма правозакрученной двойной спирали. Спирали Z-формы были получены в лабораторных условиях (при высокой температуре и очень высокой солености). В-форма РНК не была обнаружена. Разрывы в регулярной спирали А-формы, которые появляются из-за пропущенных или неподходящих оснований в одной или обеих нитях, встречаются довольно часто, и в результате образуются выступы или внутренние петли (рис. 8-23). Расположенные поблизости комплементарные участки РНК образуют шпильки. В структуре РНК заложены широкие возможности для образования двойных спиралей (рис. 8-24), поэтому шпильки — это самая часто встречающаяся вторичная структура. На конце шпилек РНК часто обнаруживаются специфические короткие последовательности оснований (такие как UUCG); известно, что они могут образовывать прочные и стабильные петли. Такие последовательности могут быть отправными пунктами при сворачивании молекулы РНК в трехмерную структуру. Важный дополнительный вклад в стабилизацию молекулы вносят водородные связи, которые не участвуют в



Двойная спираль шпильки

Рис. 8-23. Вторичные структуры в молекулах РНК. а) Выступы, внутренние петли и шпильки. б) Как показано здесь для структуры типа «шпилька», участки двойной спирали РНК обычно находятся в А-форме.

Рис. 8-24. Строение двойных спиралей в РНК. Здесь показана возможная вторичная структура РНК для М1-компонента фермента РНКазы Р из *E. coli*; в этой молекуле РНК большое количество шпилек. РНКазы Р, которая также содержит и белок (здесь не показан), участвует в созревании молекул транспортных РНК (рис. 26-27). Двумя квадратными скобками выделены две комплементарные последовательности, которые могут связываться при образовании пространственной структуры. Синими точками показано образование не-уотсон-криковской пары оснований G=U (на вставке). Обратите внимание на то, что образование пары G=C возможно только при сворачивании уже синтезированных цепей РНК или при отжиге их друг на друга. Не существует такой РНК-полимеразы (фермент, который синтезирует молекулы РНК по матрице ДНК), которая при синтезе новой молекулы РНК вставляет U напротив G или наоборот.



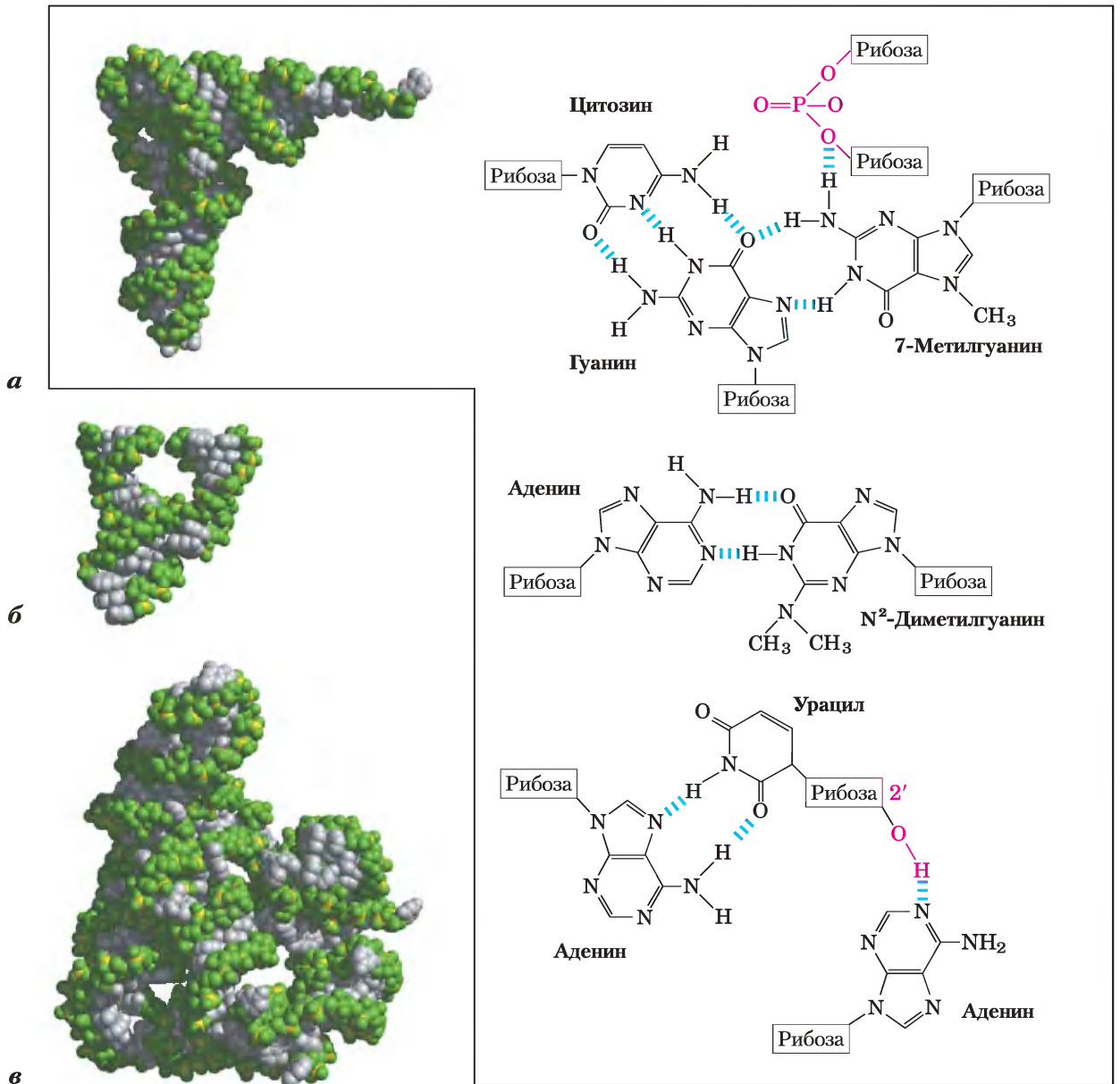


Рис. 8-25. Трехмерная структура РНК. а) Пространственное строение фенилаланиновой тРНК дрожжей (PDB ID 1 TRA). Показаны некоторые необычные пары оснований, найденные в этой тРНК. Обратите внимание на водородные связи (показаны красным) между кислородом рибозы, участвующим в образовании фосфодиэфирной связи, и 2'-гидроксильной группой другой рибозы. б) Рибозим, выделенный из определенного вируса растений, вторичная структура которого похожа на головку молотка (взято из PDB ID 1MME). Рибозимы, или РНК-ферменты, катализируют разнообразные реакции, в первую очередь реакции метаболизма РНК и синтеза белков. Сложная трехмерная организация этих РНК отражает их участие в катализе, как это было описано для белков в гл. 6. в) Сегмент мРНК, считающийся интроном (некодирующая последовательность), выделенный из реснитчатого простейшего *Tetrahymena thermophila* (взято из PDB ID 1GRZ). Этот интрон (рибозим) катализирует вырезание самого себя из участка цепи РНК, расположенного между двумя экзонами (кодирующая последовательность) (описано в гл. 26).

образовании стандартных уотсон-криковских пар. Например, водородные связи может образовывать 2'-гидроксильная группа рибозы. Некоторые из этих особенностей хорошо изучены в структуре фенилаланиновой транспортной РНК дрожжей (отвечает за включение остатка Phe в полипептиды) и в двух РНК-ферментах, или рибозимах, чьи функции, как и ферментов белковой природы, определяются трехмерной структурой (рис. 8-25).

Исследование строения РНК и выявление взаимосвязей между ее структурой и функцией — новая важная задача, где надо решать те же сложные проблемы, что и при изучении пространственной организации белка. Наше понимание строения РНК растет по мере выявления ее функций.

Краткое содержание раздела 8.2

СТРУКТУРА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

- Получено большое количество разнообразных данных, свидетельствующих в пользу того, что ДНК служит носителем генетической информации. В частности, эксперимент Эйвери, Маклеода и Маккарти показал, что ДНК, выделенная из одного бактериального штамма при попадании в клетки другого штамма может трансформировать их в клетки первого штамма, наделяя некоторыми наследственными характеристиками донора. Эксперимент Херши и Чейз показал, что ДНК бактериального вируса, а не его оболочка, переносит в клетку хозяина генетическую информацию для репликации вируса.

- Обобщив множество опубликованных данных, Уотсон и Крик постулировали, что природная ДНК состоит из двух антипараллельных цепей в форме правозакрученной спирали. Между комплементарными парами оснований, $A=T$ и $G=C$, образуются водородные связи внутри спирали. Пары оснований находятся в плоскости, перпендикулярной длинной оси двойной спирали, расстояние между соседними основаниями составляет 3,4 Å, на один оборот спирали приходится 10,5 пар оснований.

- ДНК может существовать в нескольких формах, которые отличаются друг от друга пространственным строением. Уотсон-криковская форма — это две похожие структуры — В-ДНК, А-ДНК и Z-ДНК. Некоторые структурные варианты ДНК зависят от последовательности нуклеотидов, в молекуле образуются изгибы. Цепи ДНК с определенными последовательностями могут образовывать шпильки, крестообразные структуры, а также участки трехцепочечной и четырехцепочечной ДНК.

- Матричная РНК переносит генетическую информацию от ДНК к рибосомам для синтеза белков. Транспортная РНК и рибосомная РНК также участвуют в белковом синтезе. Пространственная структура РНК довольно сложная; отдельные цепи могут сворачиваться в шпильки, принимать форму двойной спирали или образовывать сложные петли.

8.3. Химия нуклеиновых кислот

Роль ДНК как хранилища генетической информации зависит от стабильности молекулы. Химические превращения, которые с ней происходят, в отсутствие катализа протекают обычно очень медленно. Длительное хранение информации без ее изменения очень важно для клетки, а поэтому протекание даже единичных медленных реакций, которые могут изменить структуру ДНК, может оказать существенное физиологическое значение. Такие процессы, как образование злокачественных опухолей или старение, возможно, непосредственно связаны с медленным накоплением необратимых изменений ДНК. Другие, безвредные, изменения, которые могут происходить с ДНК, необходимы для ее функционирования, например разделение цепей, которое предшествует репликации ДНК или ее транскрипции. Помимо углубления понимания физиологических процессов, изучение химии нуклеиновых кислот позволяет освоить множество методов, применяемых в молекулярной биологии, медицинской практике и судебной медицине. Далее мы рассмотрим химические свойства ДНК и некоторые аспекты их практического применения.

Двойная спираль ДНК и РНК может денатурировать

Растворы бережно выделенных *природных ДНК* при рН 7,0 и комнатной температуре (25 °С) обладают высокой вязкостью. Когда такие растворы помещают в условия с экстремальными значениями рН или с температурой выше 80 °С, их вязкость резко понижается, что свидетельствует о том, что ДНК подвергается изменениям. Как и глобулярные белки, которые при высоких температурах и экстремальных значениях рН денатурируют, двойная спираль ДНК подвергается денатурации, или плавлению. Разрушение водородных связей и стекинговых взаимодействий между основаниями вызывает разворачивание двойной спирали с образованием двух одиночных цепей, полностью отделенных друг от друга

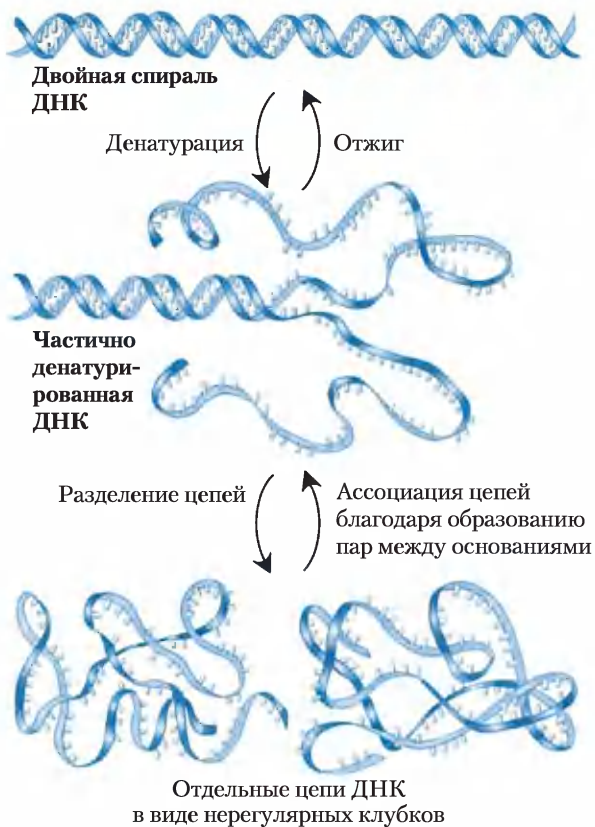


Рис. 8-26. Обратимая денатурация и отжиг (ренатурация) ДНК.

вдоль всей длины или какого-то участка спирали (частичная денатурация). Ни одна ковалентная связь в ДНК не разрушается (**рис. 8-26**).

Если две цепи все еще образуют сегмент двойной спирали, содержащий 10 или более остатков, то ренатурация молекулы ДНК представляет собой быстрый процесс в одну стадию. Когда температура или рН возвращается к физиологической норме, несвязанные участки двух цепей спонтанно собираются (**отжигаются**) и снова образуется исходный дуплекс (рис. 8-26). Если две цепи полностью разделены, ренатурация происходит в две стадии. На первой, более медленной, две цепи «находят» друг друга при случайных флуктуациях и формируют короткий сегмент двойной спирали из комплементарных цепей. Вторая стадия протекает значительно быстрее: оставшиеся неспаренными основания образуют пары оснований, и две цепи соединяются в двойную спираль.

Тесные контакты между соседними основаниями в одной цепи нуклеиновой кислоты приводят к тому, что поглощение в УФ-области по сравнению с раствором, содержащим ту же концентрацию нуклеотидов, уменьшается; еще меньшее поглощение наблюдается при соединении двух комплементарных цепей нуклеиновых кислот. Это явление называется гипохромным эффектом. При денатурации двойной спирали наблюдается противоположный результат: увеличение поглощения называется гиперхромным эффектом. Таким образом, переход ДНК от двойной спирали к одноцепочечной структуре можно наблюдать по изменению поглощения в УФ-области спектра при 260 нм.

Молекулы ДНК вирусов или бактерий в растворе денатурируют при небольшом нагревании (**рис. 8-27**). Каждый тип ДНК характеризуется температурой денатурации (температурой плавления, $t_{пл}$): высокое содержание пар G≡C приводит к повышению температуры плавления ДНК. Это происходит из-за того, что в образовании пары G≡C участвует три водородные связи, для разрыва которых требуется больше тепловой энергии, чем для диссоциации пар A=T. При осторожном нагревании регионы, богатые парами A=T, будут денатурировать, в то время как большая часть ДНК останется в виде двойной спирали. Денатурированные регионы (называемые пузырями) можно наблюдать в электрон-

ном микроскопе (рис. 8-28). Разделение цепей ДНК, происходящее *in vivo* в таких процессах, как репликация ДНК или транскрипция, тоже начинается с участков, богатых парами А=Т; мы покажем это далее.

Дуплексы из двух цепей РНК или одной цепи РНК и одной цепи ДНК (РНК-ДНК-гибриды) также могут подвергаться денатурации. Примечательно, что двухцепочечные РНК более стабильны, чем ДНК. При нейтральных значениях рН для денатурации РНК требуются температуры выше на 20 °С или более, чем для денатурации молекулы ДНК сравнимой последовательности. По стабильности РНК-ДНК-

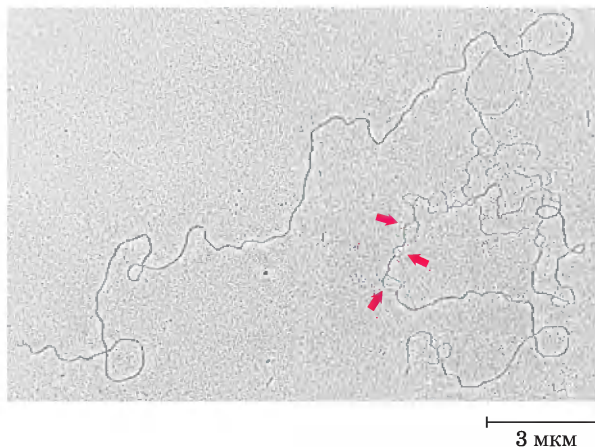
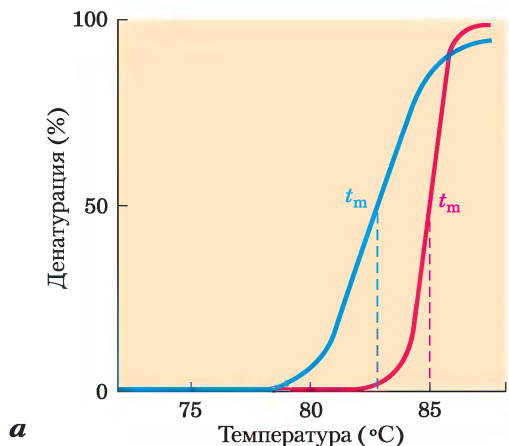
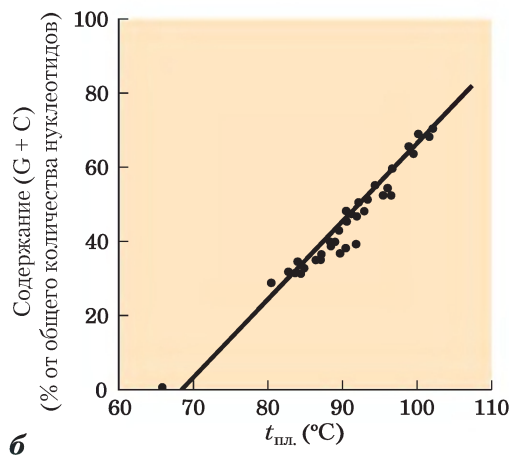


Рис. 8-28. Частично денатурированная ДНК. Эта молекула ДНК была частично денатурирована, а затем препарат зафиксировали для предотвращения процесса ренатурации. При создании этой фотографии для повышения контрастности использовался метод оттенения, что увеличило диаметр ДНК примерно в 5 раз, и сделало неразличимым большинство деталей спирали. Тем не менее можно измерить длину нитей, а одноцепочечные регионы легко отличить от двухцепочечных. Стрелками показаны одноцепочечные петли («пузыри»), где уже прошла денатурация. Эти быстро денатурировавшие участки богаты парами оснований А=Т и легко ренатурируют.



а



б

Рис. 8-27. Тепловая денатурация ДНК. а) Кривые денатурации (плавления) ДНК двух типов. Точка перегиба кривой (средняя точка) определяет температуру плавления ($t_{пл.}$); она зависит от рН, ионной силы раствора и состава ДНК. б) Зависимость $t_{пл.}$ от содержания в ДНК пар G=C.

гибриды, как правило, занимают промежуточное положение между дуплексами РНК и дуплексами ДНК. Чем обусловлены такие различия в тепловой стабильности, пока неизвестно.

Нуклеиновые кислоты разных видов могут образовывать гибриды

Способность двух комплементарных цепей ДНК образовывать пары друг с другом может быть использована для обнаружения похожих последовательностей ДНК у двух разных видов или в геноме одного вида. Если дуплексы молекул ДНК, изолированных из клеток человека и мыши, полностью денатурировать под действием температуры, а затем выдержать при 25 °С в течение многих часов, большая часть ДНК ренатурирует. Скорость отжига ДНК зависит от температуры, длины фрагмента ДНК, концентрации ДНК, концентрации солей в реакционной смеси и свойств самой последовательности (например, ее сложности и (G + C)-состава). Особенно важную роль играет температура. Если температура

слишком низкая, короткие последовательности со случайным сходством, расположенные в отдаленных участках молекулы ДНК, связываются с матрицей и мешать общему выстраиванию комплементарной последовательности. При слишком высокой температуре происходит денатурация ДНК. Почти все цепи ДНК мыши отождутся с комплементарными цепями мышинной ДНК; похожим образом почти все цепи ДНК человека образуют комплементарные структуры с цепями человеческой ДНК. Тем не менее некоторые цепи ДНК мыши свяжутся с цепями ДНК человека с образованием **гибридных дуплексов**, в которых сегменты ДНК мыши образуют двойные спирали с сегментами ДНК человека (рис. 8-29). Это отражает общее эволюционное происхождение; как правило, в различных организмах встречаются белки и молекулы РНК с похожими функ-

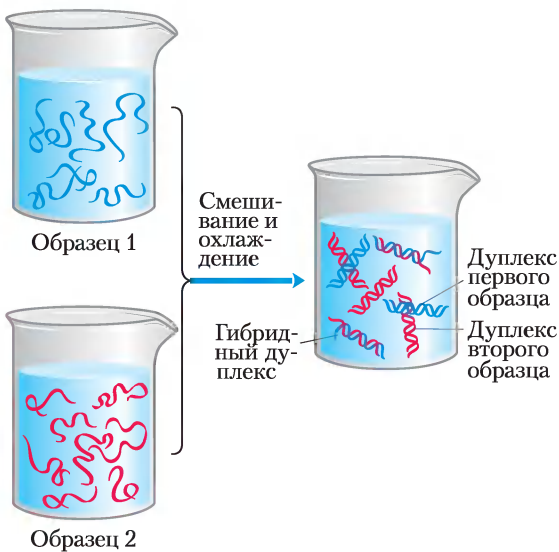


Рис. 8-29. Гибридизация ДНК. Два образца ДНК можно сравнить, если полностью денатурировать их под действием температуры. Если оба раствора смешать и медленно охлаждать, большинство цепей ДНК каждого образца образуют обычные, те же, что были и до плавления, комплементарные двойные спирали. Если же две последовательности нитей ДНК из разных образцов обладают значительным сходством, они могут образовывать дуплексы, или гибриды, друг с другом: чем больше похожи молекулы ДНК, тем больше образуется гибридов. Существует несколько методов, с помощью которых можно измерить количество образованных гибридов. Один из образцов ДНК обычно метят радиоактивным изотопом для упрощения измерений.

циями и часто с похожим строением. Во многих случаях участки ДНК, в которых закодированы эти белки и молекулы РНК, имеют похожую последовательность. Чем более близки эволюционно друг к другу организмы двух видов, тем более вероятно, что их молекулы ДНК смогут образовывать гибриды. Например, ДНК человека более охотно связывается с ДНК мыши, чем с ДНК дрожжей.

На способности к гибридизации цепей ДНК из разных источников основано несколько лабораторных методов, необходимых для развития современной молекулярной генетики. Специфические последовательности ДНК или ген можно обнаружить даже в присутствии большого количества других последовательностей, при наличии подходящей комплементарной цепи ДНК (обычно меченной каким-либо образом), которая может образовывать гибриды с искомой (гл. 9). Комплементарные цепи ДНК можно взять из разных видов, или из одного и того же вида, или синтезировать химическими методами в лаборатории с использованием технологий, которые будут описаны дальше в этой главе. Для обнаружения специфической РНК, а не ДНК, методы гибридизации могут быть изменены. Модифицированные методы гибридизации используют при выделении и идентификации специфических генов и молекул РНК. Их применение делает возможным опознать человека по одному волосу, оставленному на месте преступления, или предсказать риск заболевания за десятилетия до проявления симптомов (доп. 9-1).

Нуклеотиды и нуклеиновые кислоты подвергаются неферментативным превращениям

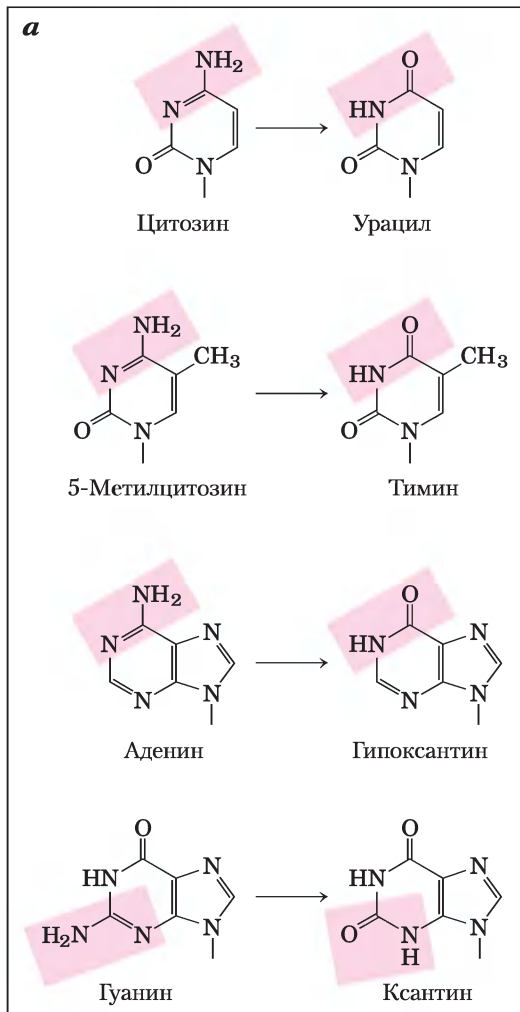
Рис. В составе нуклеотидов ковалентная структура пуринов и пиримидинов подвергается ряду спонтанных изменений. Скорость этих реакций обычно *очень низкая*, но они имеют физиологическое значение из-за малой устойчивости клетки к изменениям генетической информации. Изменения в структуре ДНК, которые приводят к постоянным изменениям закодированной в ней генетической информации, называются **мутациями**, и существуют данные, свидетельствующие в пользу существования тесной связи между нако-

плением мутаций в организме и процессами старения и образования раковых опухолей.

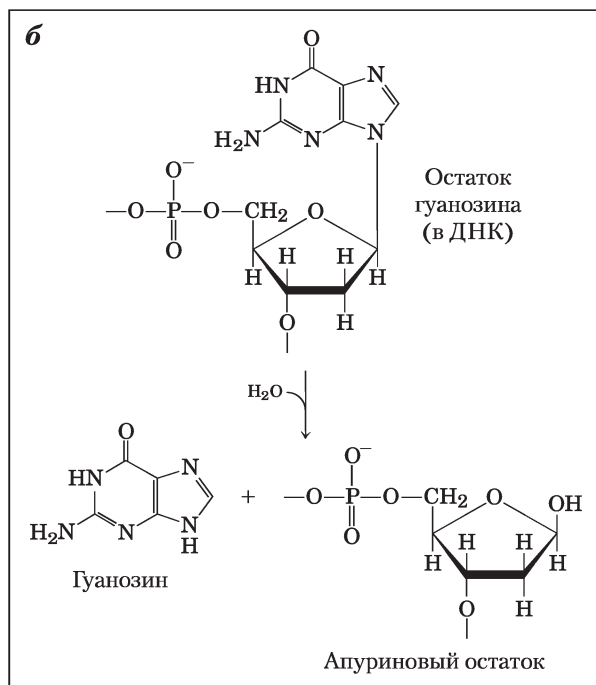
Некоторые основания нуклеотидов могут случайно терять аминогруппы, не включенные в гетероцикл (в реакции дезаминирования) (рис. 8-30, а). Например, при физиологических условиях дезаминирование цитозина (в ДНК) до

урацила происходит в одном из 10^7 остатков цитидина за 24 часа. Это соответствует примерно 100 случайным превращениям за день в клетке млекопитающих. Дезаминирование аденина и гуанина происходит со скоростью, примерно в 100 раз меньше.

Медленное дезаминирование цитозина кажется достаточно безвредным, но почти наверняка именно по этой причине ДНК содержит тимин вместо урацила. Продукт дезаминирования цитозина (урацил) легко узнается как чуждый элемент в ДНК и удаляется системой репарации (гл. 25). Если бы ДНК в норме содержала урацил, узнавание продуктов дезаминирования цитозина усложнилось бы, а неустранимые остатки урацила могли привести к изменению последовательности нуклеотидов, так как они образуют пару с аденинами в процессе репликации. Дез-



Реакция дезаминирования



Реакция депурикации

Рис. 8-30. Некоторые хорошо изученные неферментативные реакции, в которых участвуют нуклеотиды. а) Реакции дезаминирования. Показаны только основания. б) Реакция депурикации, в которой происходит гидролиз N-β-гликозидной связи и отщепление (потеря) пурина. Потеря пиримидиновых оснований может быть обусловлена сходной реакцией, но протекает гораздо медленнее. Образующиеся повреждения, в которых сохраняется дезоксирибоза, но нет основания, называют AP-сайтами (апуриновый или, редко, апириимидиновый сайт). Дезоксирибоза, оставшаяся после этой реакции, легко переходит из β-фуранозной в альдегидную форму (рис. 8-3). Другие неферментативные реакции показаны на рис. 8-31 и 8-32.

аминирование цитозина постепенно привело бы к уменьшению содержания пар G≡C и увеличению содержания пар A=T в ДНК всех клеток. За миллионы лет дезаминирование цитозина могло бы привести к полному вытеснению пар G≡C и изменению генетического кода. Таким образом использование тимина в качестве одного из четырех оснований ДНК стало решающим моментом в эволюции и сделало возможным длительное хранение генетической информации.

Другая важная реакция дезоксирибонуклеотидов — это гидролиз N-β-гликозидной связи между основанием и пентозой (рис. 8-30, б). С пуринами это происходит чаще, чем с пиримидинами. При обычных условиях в клетке каждые 24 часа из ДНК теряется примерно один из 10⁵ пуринов (10 000 на клетку млекопитающего).

Депуринизация рибонуклеотидов и РНК происходит намного медленнее и считается физиологически незначимой. В пробирке скорость потери пуринов может быть ускорена добавлением кислоты. Инкубация ДНК при pH около 3 вызывает выборочное удаление пуриновых оснований, в результате чего образуется производное, которое называется апуриновой кислотой.

Другие реакции обусловлены различными видами излучения. УФ-Излучение вызывает конденсацию двух этиленовых групп с образованием циклобутанового кольца. В клетке такая же реакция может происходить между соседними пиримидиновыми основаниями в нуклеиновых кислотах с образованием циклобутановых пиримидиновых димеров. Наиболее часто это происходит между тиминовыми остатками, расположенными по со-

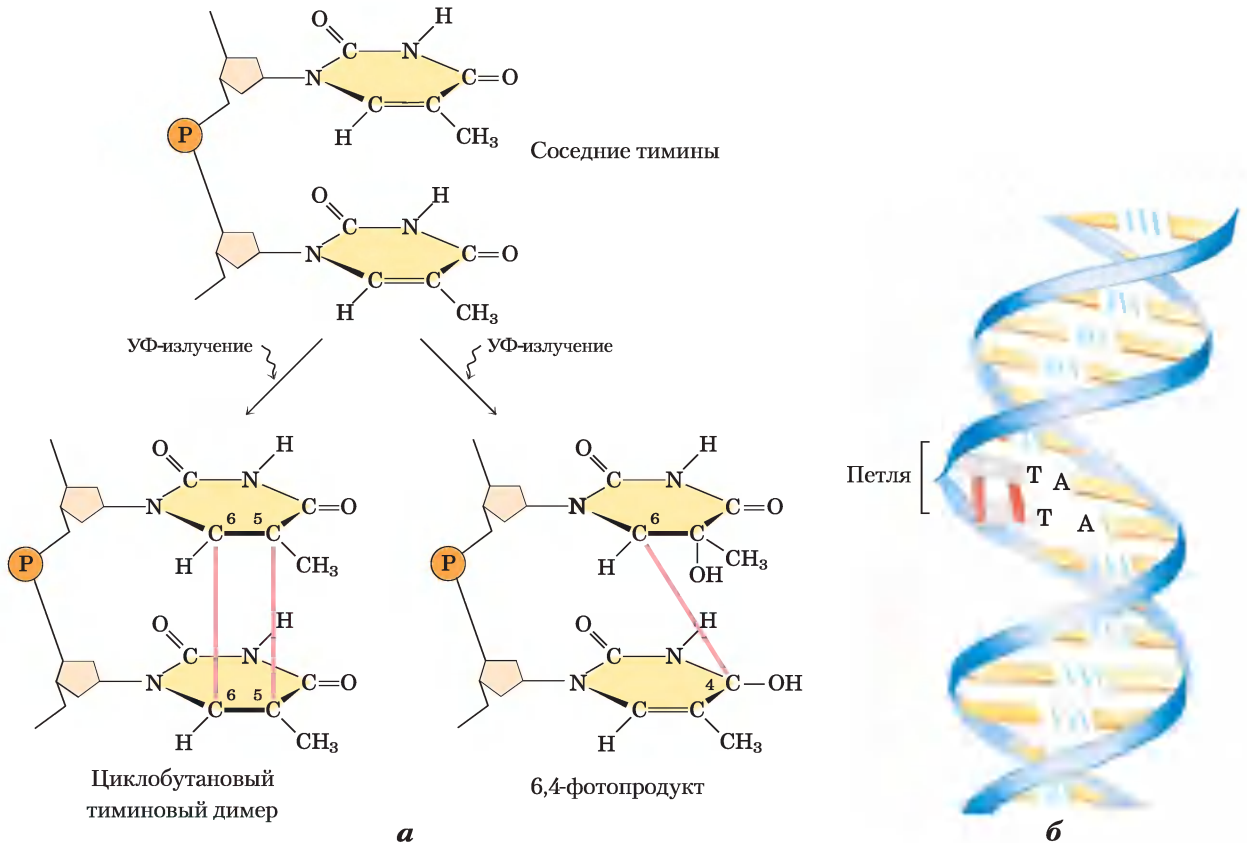


Рис. 8-31. Образование пиримидиновых димеров под действием УФ-излучения. *а*) В результате одной реакции (слева) образуется четырехуглеродный цикл, в состав которого входят атомы С-5 и С-6 соседних пиримидиновых остатков. В другой реакции (справа) формируется 6,4-фотопродукт, в котором связаны атомы С-6 и С-4 соседних пиримидиновых остатков. *б*) Появление циклобутановых пиримидиновых димеров вызывает образование изгиба или петли в молекуле ДНК.

седству в одной и той же цепи ДНК (рис. 8-31). Второй тип пиримидиновых димеров, так называемый 6,4-фотопродукт, также образуется под воздействием УФ-излучения. Ионизирующее излучение (рентгеновские и γ -лучи) может вызывать раскрытие цикла и фрагментацию оснований, так же как и разрыв ковалентных связей в остове нуклеиновых кислот.

Фактически все формы жизни подвергаются действию высокоэнергетического излучения, способного вызывать химические повреждения в ДНК. Известно, что излучение в области, близкой к УФ (с длинами волн от 200 до 400 нм), которое составляет значительную часть солнечного спектра, способно вызывать образование пиримидиновых димеров и другие химические изменения в ДНК бактерий и в клетках нашей кожи. Мы находимся под постоянным воздействием ионизирующего излучения в виде космических лучей и радиации, излучаемой радиоактивными элементами, такими как радий, плутоний, уран, радон, ^{14}C и ^3H . Рентгеновские лучи с целью медицинской и стоматологической диагностики, а также в радиационной терапии рака и других заболеваний также относятся к ионизирующему излучению. Приблизительно 10% всех повреждений ДНК, вызываемых внешними агентами, происходит под действием УФ и ионизирующего излучений.

Повреждения молекулы ДНК могут быть также вызваны химикатами из промышленных отходов. Эти вещества сами по себе, возможно, безвредны, но в клетке они могут метаболизироваться в токсичные продукты. Существуют два наиболее важных класса таких веществ (рис. 8-32): (1) дезаминирующие агенты, в частности азотистая кислота (HNO_2) или соединения, которые могут быть превращены в азотистую кислоту или нитриты, и (2) алкилирующие агенты.

Азотистая кислота, образованная из органических предшественников, таких как нитрозамины, нитриты и нитраты, сильно ускоряет реакцию дезаминирования оснований. Похожее действие оказывает бисульфит. Оба реагента используются в качестве консервантов при хранении продуктов для того, чтобы предотвратить размножение токсичных бактерий. При этом они не вызывают значительного увеличения риска развития рака, возможно, потому что используются в небольших количествах, потому вносят минимальный вклад в процессы повреждения ДНК. (Если не использовать эти консерванты, испорченные продукты могут нанести намного больший вред здоровью.)

Алкилирующие агенты способны изменять определенные основания ДНК. Например, высокоактивное соединение диметилсульфат (рис. 8-32, б) может метилировать гуанин с

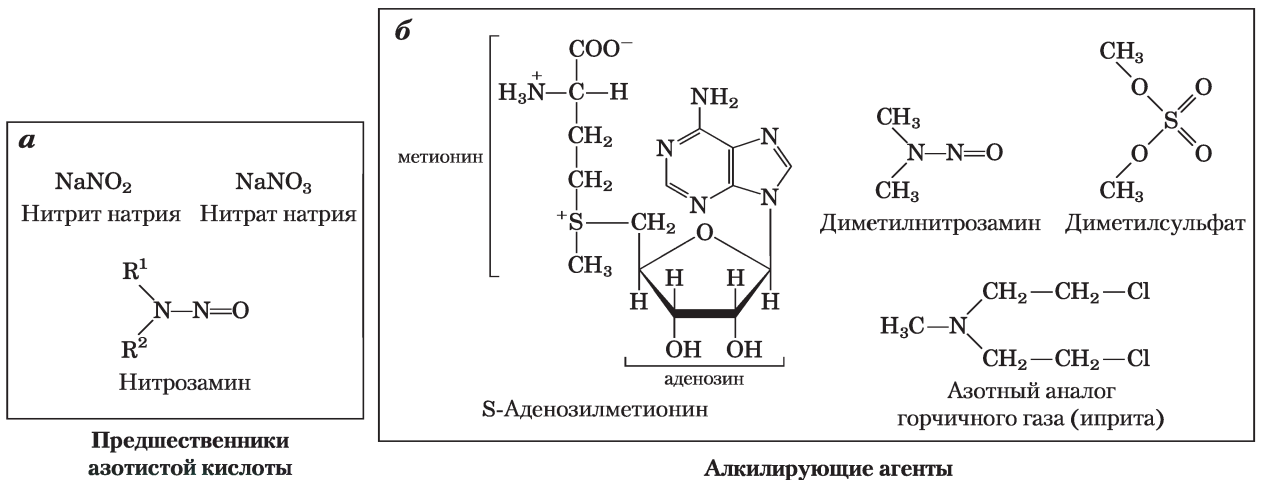
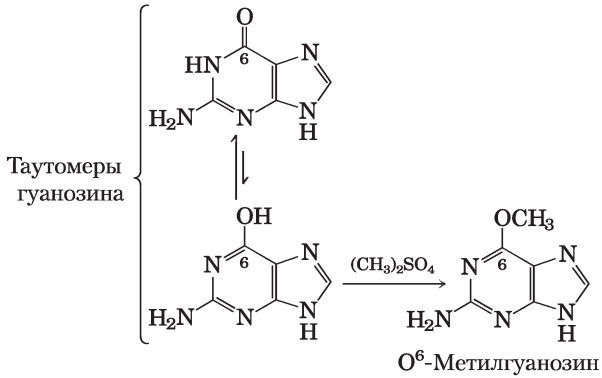


Рис. 8-32. Химические реагенты, которые вызывают повреждения ДНК. а) Предшественники азотистой кислоты, которая ускоряет реакции дезаминирования. б) Алкилирующие агенты.

образованием O^6 -метилгуанина, который не способен давать пару с цитозином.



В клетке под действием природных соединений, таких как *S*-аденозилметионин, в норме протекает много похожих реакций.

Самым главным источником мутаций служит окислительное повреждение ДНК. Активные формы кислорода — пероксид водорода, гидроксильные радикалы и супероксид-анионы — образуются под действием излучения или в качестве побочных продуктов реакций аэробного метаболизма. Наибольший вклад в окислительные повреждения ДНК вносят именно гидроксильные радикалы. Клетки обладают довольно развитой системой защиты от активных форм кислорода; она включает в себя в том числе различные ферменты, такие как каталаза и супероксиддисмутаза, которые превращают соединения кислорода в безопасные вещества. Некоторые окислители, тем не менее, обходят эту систему защиты и повреждают ДНК, вступая в разнообразные реакции — от окисления дезоксирибозы и оснований и заканчивая разрывом цепи. Точная оценка количества таких повреждений пока невозможна, но в любой клетке человека ДНК каждый день участвует в тысячах подобных разрушительных реакциях окисления.

Это только часть наиболее изученных реакций, при которых повреждается ДНК. Большое количество канцерогенных веществ в пище, воде или воздухе индуцируют изменения оснований ДНК, что вызывает рак. Тем не менее целостность биополимера ДНК поддерживается намного лучше, чем РНК или белка, потому что ДНК — это единственная макромолекула, которая защищена системой биохимической репарации. Благодаря процессам репарации (описанным в гл. 25) значительно снижается степень повреждения ДНК. ■

ДНК метилирована по некоторым основаниям

Определенные основания нуклеотидов в молекуле ДНК ферментативно метилируются. Метилированные аденин и цитозин встречаются гораздо чаще, чем метилированные гуанин и тимин. Метилирование обычно происходит в определенных последовательностях или участках молекулы ДНК. В некоторых случаях функциональное значение метилирования хорошо изучено; в других оно остается неясным. Все известные метилазы ДНК используют в качестве донора метильной группы *S*-аденозилметионин (рис. 8-32, б). У *E. coli* существуют две известные системы, обеспечивающие метилирование ДНК. Одна из них служит частью механизма защиты, который позволяет клетке отличать свою ДНК от чужой, помечая свою собственную ДНК метильными группами и разрушая (чужую) ДНК, которая не содержит метильных групп (эта система известна как система рестрикции-модификации, см. гл. 9). Другая система выполняет метилирование остатков аденозина с образованием N^6 -метиладенозина в последовательности (5')GATC(3') (рис. 8-5, а). Этот процесс опосредован Dam-метилазой (от англ. *DNA adenine methylation*), компонентом системы, которая восстанавливает случайно пропущенные основания при репликации ДНК (см. с. 435).

В эукариотических клетках около 5% остатков цитидина ДНК метилированы до 5-метилцитидина (рис. 8-5, а). Метилирование происходит чаще всего в CpG-последовательностях (CpG-островки), в результате чего образуются симметричные метил-CpG-последовательности в обеих цепях ДНК. Степень метилирования CpG-островков варьирует по участкам больших молекул эукариотических ДНК.

Последовательность нуклеотидов ДНК можно определить

Способность ДНК хранить информацию связана с такой важнейшей ее характеристикой, как последовательность нуклеотидов. До конца 1970-х гг. определение последовательностей нуклеиновых кислот даже из 5–10 нуклеотидов представляло собой сложную задачу и было очень трудоемким исследованием. Развитие двух новых методов в 1977 г. (авторы одного — Алан Максам и Вальтер Гильберт, а другого — Фредерик Сенгер) сделало

возможным выполнять секвенирование, т. е. определение последовательности, даже более длинных молекул ДНК с легкостью, которую несколько десятилетий назад нельзя было даже представить. Методы основаны на более глубоком понимании химии нуклеотидов и метаболизма ДНК, а также на электрофоретическом разделении фрагментов ДНК, различающихся только

по одному нуклеотиду. Электрофорез ДНК похож на электрофорез белков (рис. 3-18). В случае коротких молекул ДНК (до нескольких сотен пар оснований) чаще используют полиакриламидный гель; на агарозе обычно разделяют более длинные последовательности ДНК.

В методах секвенирования по Сенгеру и по Максому–Гильберту основным принципом

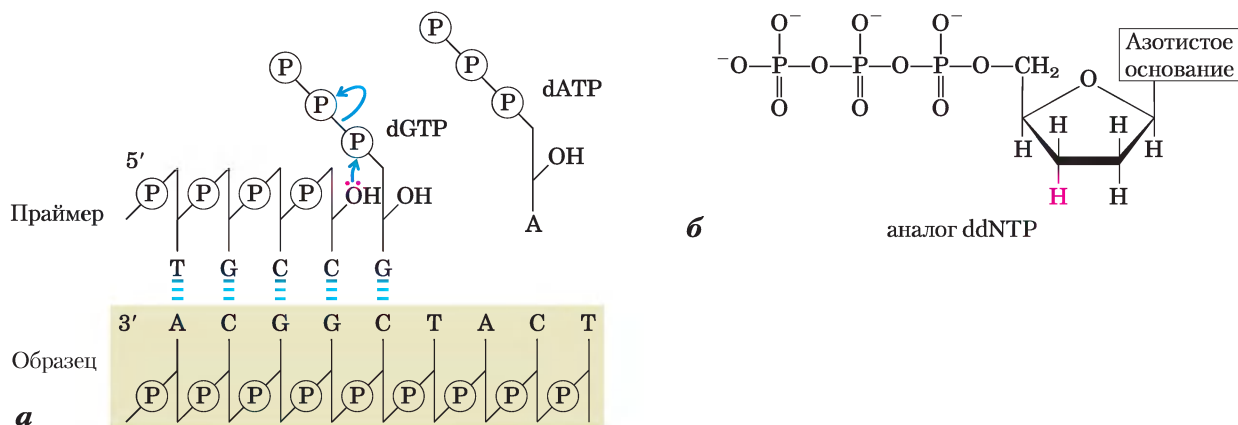
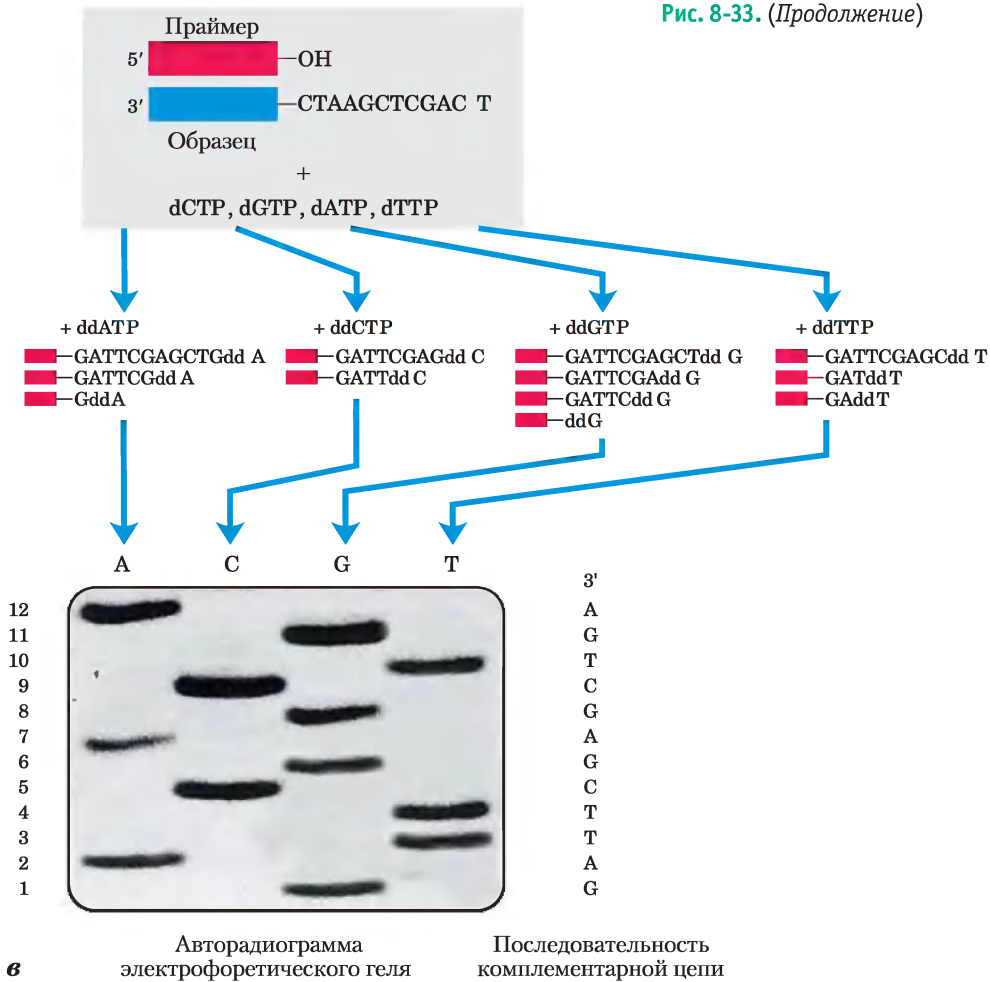


Рис. 8-33. Секвенирование ДНК по методу Сенгера. В этом методе используется способность ДНК-полимераз синтезировать ДНК (гл. 25). *а*) Для работы ДНК-полимеразы необходим праймер (короткий олигонуклеотидный фрагмент), к которому добавляются нуклеотиды, и матрица, по которой происходит подбор каждого нового нуклеотида. В пробирках 3'-гидроксильная группа праймера взаимодействует с добавленными дезоксирибонуклеозидтрифосфатами (dNTP) с образованием фосфодиэфирной связи. *б*) Секвенирование по методу Сенгера происходит с использованием аналогов дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP) для остановки синтеза ДНК. (Метод Сенгера также известен как дидезокси-метод.) Когда ddNTP встает на место dNTP, рост цепи прекращается, так как у него отсутствует 3'-гидроксильная группа, необходимая для осуществления следующего шага синтеза. *в*) ДНК, последовательность которой нужно расшифровать, используется в качестве матрицы, а короткие праймеры, меченные радиоактивной или флуоресцентной меткой, отжигаются на ней. Если добавить небольшие количества ddNTP одного типа, например ddCTP, к стандартной реакционной смеси, то синтез цепи будет преждевременно останавливаться на тех нуклеотидах, где в норме встраиваются dC. При избытке dCTP по сравнению с ddCTP шанс включения аналога на место dC довольно мал. Концентрацию ddCTP подбирают таким образом, чтобы с большой вероятностью этот нуклеотид встраивался по какому-то одному положению в каждой синтезируемой цепи. В результате в растворе образуется смесь меченых фрагментов, каждый из которых заканчивается на остаток C. Каждый остаток C в последовательности приводит к накоплению набора фрагментов определенной длины, так что фрагменты разной длины, разделенные электрофорезом, показывают локализацию остатков C. Процедура повторяется по отдельности для каждого из четырех ddNTP, и последовательность можно прочитать прямо по авторадиограмме геля. Так как более короткие фрагменты ДНК мигрируют быстрее, то те из них, которые расположены рядом с нижним краем геля, соответствуют ближайшим к праймеру нуклеотидам (5'-конец), а последовательность следует читать снизу вверх (в направлении 5'→3'). Обратите внимание на то, что полученная таким образом последовательность комплементарна анализируемой цепи.

(Продолжение рис. 8.33 на следующей странице)

Рис. 8-33. (Продолжение)



является получение четырех наборов меченых фрагментов ДНК. Реакция образования каждого фрагмента, принадлежащего к одному набору, специфична по определенному основанию, которое находится на 3'-конце. Таким образом получается, что длина фрагмента соответствует положению, в котором находится конкретное основание. Например, из олигонуклеотида, имеющего последовательность рААТСГАСТ, меченного по 5'-концу (левый конец), в реакции расщепления по остатку С получают два меченых фрагмента: один содержит четыре нуклеотида, другой — семь; в реакции расщепления по остатку G — только один меченый фрагмент из пяти нуклеотидов. Так как все олигонуклеотиды мечены только по одному 5'-концу на авторадиограмме, видны только те фрагменты ДНК, которые содержат концевой 5'-нуклеотид. Размер фрагментов соответствует положению С и G остатков относительно 5'-кон-

ца. Если наборы фрагментов, соответствующие каждому из четырех нуклеотидов, разделить электрофорезом на соседних дорожках, они образуют полосы, по которым можно сразу «прочитать» последовательность (рис. 8-33). Мы описали здесь только метод Сенгера, потому что он легче и более широко применяется. Для его осуществления нужны радиоактивно меченные праймеры, дидезоксинуклеотиды и проведение ферментативного синтеза цепи ДНК, комплементарной анализируемой ДНК.

Секвенирование ДНК может быть автоматизировано с помощью небольшого изменения метода Сенгера, в котором дидезоксинуклеотиды для каждой реакции метят разными флуоресцентными зондами (рис. 8-34). Этот метод позволяет за несколько часов определить последовательность ДНК, содержащую тысячи нуклеотидов. На данный момент полно-

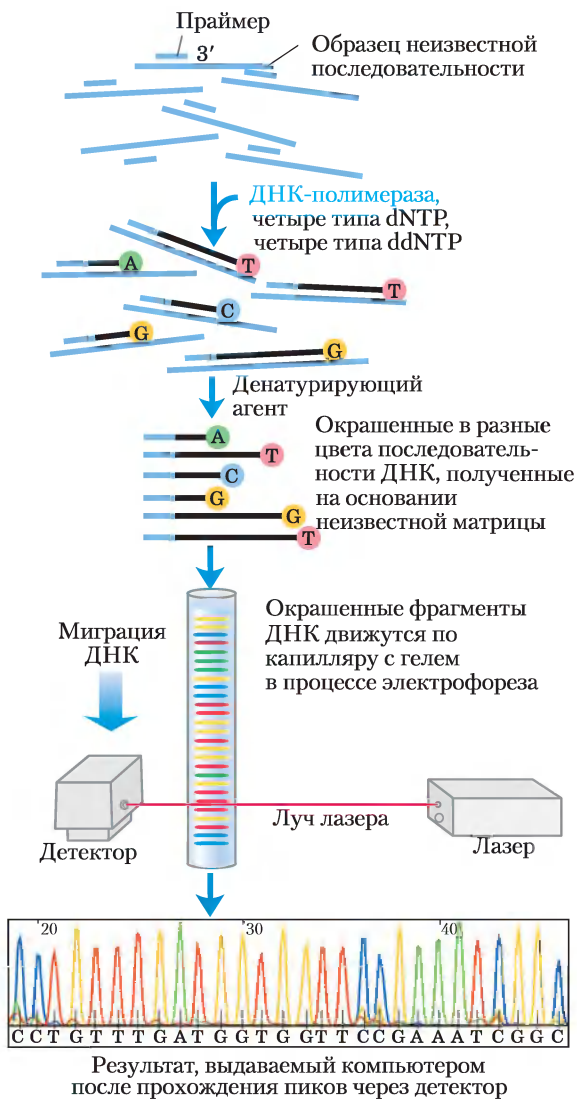


Рис. 8-34. Способ автоматизации реакций определения последовательности ДНК. Каждый дидезоксирибонуклеотид, используемый в методе Сенгера, можно связать с флуоресцентной молекулой, которая окрашивает все фрагменты ДНК, заканчивающиеся на конкретный нуклеотид, в один и тот же цвет. Все четыре меченных разными метками ddNTP добавляют в одну пробирку. Образующиеся окрашенные фрагменты ДНК затем разделяются по размеру в электрофоретическом геле, содержащемся в капилляре (это усовершенствование позволяет осуществлять более быстрое разделение). Все фрагменты одной длины движутся по капилляру с одной скоростью и в конечном итоге образуют один пик, а цвет каждого пика определяется позже с помощью луча лазера. Последовательность ДНК читают после определения последовательности цветов пиков, которые проходят через детектор. Вся информация поступает в компьютер, который выдает результат в виде готовой последовательности.

стью секвенированы геномы многих организмов (см. табл. 1-2), и огромное число проектов секвенирования ДНК еще продолжается. Пожалуй, наиболее претенциозный из них — это проект «Геном человека», в котором исследователи секвенировали свыше 3,2 миллиардов пар оснований ДНК человеческой клетки (гл. 9).

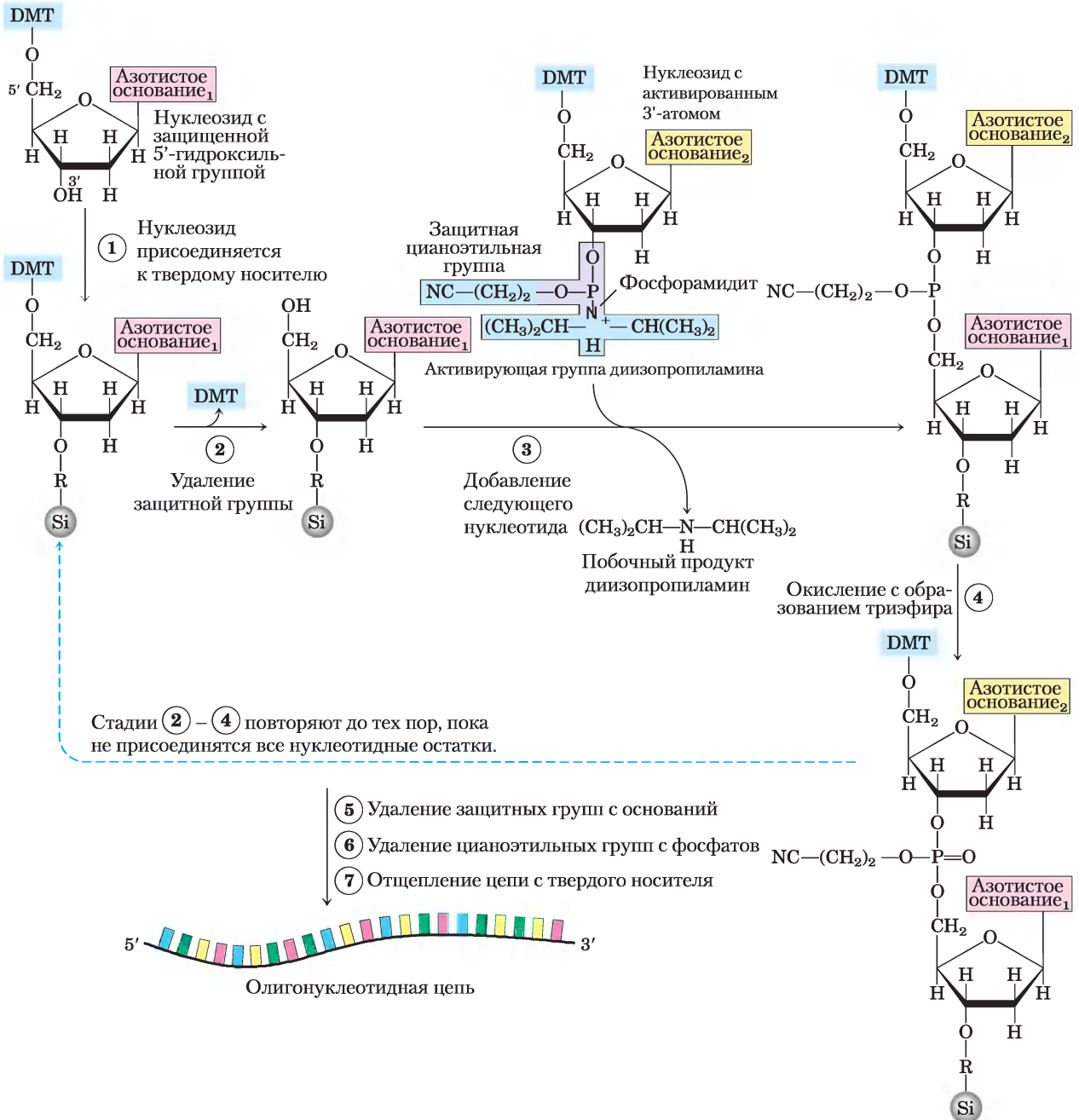
Дидезоксисеквенирование ДНК

Рис. 8-35. Химический синтез ДНК фосфорамидитным методом. Автоматизированный синтез ДНК похож на синтез полипептидов на твердом носителе. Олигонуклеотиды синтезируются на твердом носителе (силикагель) в многостадийном процессе, на каждом этапе которого присоединяется по одному нуклеотиду. В повторяющихся химических реакциях по одному добавляются соответствующие нуклеотидные предшественники с защищенными группами, которые блокируют основания, не участвующие в реакции. ① Первый нуклеозид (который будет крайним с 3'-конца) присоединяется к силикагелю через 3'-гидроксил (через связывающую группу R), а 5'-гидроксил защищает неустойчивая к действию кислот диметокситригильная группа (DMT). ② Защитная группа удаляется при промывании колонки кислотой (DMT-группа окрашена, поэтому эту реакцию можно наблюдать спектрофотометрически). ③ Следующий нуклеотид на 3'-конце имеет активную фосфорамидитную группу — содержит трехвалентный фосфор (фосфит отличается от более окисленного фосфата, где фосфор пятивалентен; в нуклеиновых кислотах обычно присутствует пятивалентный фосфор), в котором один кислород заменен аминогруппой или замещенным аминном. В представленном типичном варианте один кислород фосфорамидитной группы связан с дезоксирибозой, другой защищен цианэтильной группой, а третья позиция занята легко замещаемой диизопропиламиногруппой. В результате реакции с иммобилизованным нуклеотидом образуется 5',3'-связь, а диизопропиламиногруппа удаляется. На стадии ④ связь с фосфитом окисляется иодом, что дает в итоге фосфодиэфирную связь. Реакции ②–④ повторяются до тех пор, пока не будут добавлены все нуклеотиды. На каждой стадии избыток непрореагировавших нуклеотидов удаляют перед добавлением в смесь нуклеотидов другого типа. На стадиях ⑤ и ⑥ оставшиеся защитные группы на основаниях и фосфатах удаляются; на стадии ⑦ олигонуклеотид снимают с твердого носителя и отчищают. Химический синтез РНК более сложен, потому что необходимо защищать 2'-гидроксильную группу, не влияя на реакционную способность 3'-гидроксила.

Химический синтез ДНК автоматизирован

Другое очень важное достижение в химии нуклеиновых кислот — быстрый и точный химический синтез коротких олигонуклеотидов любой заданной последовательности. Химические методы синтеза были разработаны Х. Гобиндом Кораной и его коллегами в 1970-х гг. Усовершенствования, сделанные Робертом Летсингером и Марвином

Карутерсом, позволили широко использовать химический метод синтеза, который получил название фосфорамидитного метода (рис. 8-35). Синтез осуществляется путем наращивания цепей, прикрепленных к твердому носителю; принцип метода аналогичен синтезу пептидов по Меррифилду (рис. 3-29). Продуктивность каждого последующего шага довольно высока, что позволяет синтезировать полимеры, содержащие от 70 до



80 нуклеотидов, а в некоторых специально оборудованных лабораториях — и более длинные цепи. Доступность ДНК с запланированной последовательностью очень продвигает биохимические исследования (гл. 9).

Краткое содержание раздела 8.3 ХИМИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

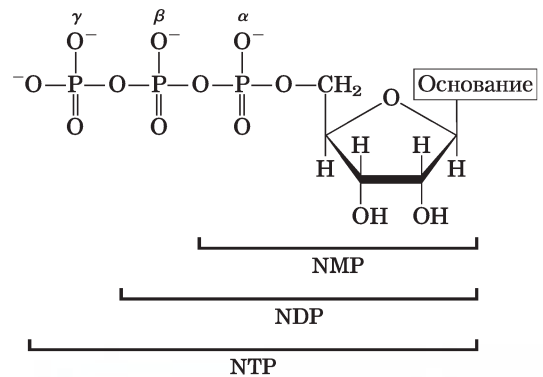
- Природная ДНК подвергается обратимому раскручиванию и разделению цепей (плавлению) при повышении температуры или при экстремальных значениях pH. Температура плавления ДНК, содержащей большое количество пар G=C, выше, чем температура плавления ДНК, в которой преобладают пары A=T.
- Денатурированные одноцепочечные молекулы ДНК из двух организмов разных видов могут соединяться в гибридный дуплекс, вероятность образования которого зависит от сходства последовательностей. Гибридизация служит основой важных методов, используемых для изучения и выделения специфических генов и молекул РНК.
- Молекула ДНК — это относительно стабильный полимер. Случайные реакции, такие как дезаминирование определенных оснований, гидролиз N-гликозидных связей между сахаром и основанием, образование пиримидиновых димеров под действием радиации и окислительные повреждения, протекают с очень низкими скоростями, что имеет большое значение для клеток, поскольку им необходимо сохранять свой генетический материал.
- Последовательность ДНК можно определить, а полимеры ДНК синтезировать простыми автоматизированными способами, в которых используются химические и ферментативные реакции.

8.4. Другие функции нуклеотидов

Нуклеотиды кроме роли мономеров нуклеиновых кислот выполняют ряд других функций в каждой клетке: служат в качестве переносчиков энергии, компонентов кофакторов ферментов и химических сигнальных молекул.

Нуклеотиды переносят химическую энергию в клетке

К фосфатной группе, ковалентно соединенной с 5'-гидроксильной группой рибонуклеотида, могут присоединиться одна или две дополнительных фосфатные группы. Образующиеся молекулы называются нуклеозидмоно-, нуклеозидди- или нуклеозидтрифосфатами (рис. 8-36). Считая от рибозы, три фосфата обычно обозначают греческими буквами α , β , и γ соответственно. При гидролизе нуклеозидтрифосфатов выделяется химическая энергия, необходимая для осуществления широкого набора клеточных реакций. Чаще всего для этой цели в клетке ис-



Аббревиатура, используемая для рибонуклеозид-5'-фосфатов			
Основание	Моно-	Ди-	Три-
Аденин	AMP	ADP	ATP
Гуанин	GMP	GDP	GTP
Цитозин	CMP	CDP	CTP
Урацил	UMP	UDP	UTP

Аббревиатура, используемая для дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатов			
Основание	Моно-	Ди-	Три-
Аденин	dAMP	dADP	dATP
Гуанин	dGMP	dGDP	dGTP
Цитозин	dCMP	dCDP	dCTP
Тимин	dTMP	dTDP	dTTP

Рис. 8-36. Нуклеозидфосфаты. Общая структура нуклеозид-5'-моно-, нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфатов (NMP, NDP и NTP) и их стандартные аббревиатуры. В дезоксирибонуклеозидфосфаты (dNMP, dNDP, dNTP) входит пентоза 2'-дезоксид-Д-рибоза.

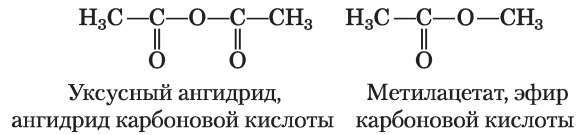
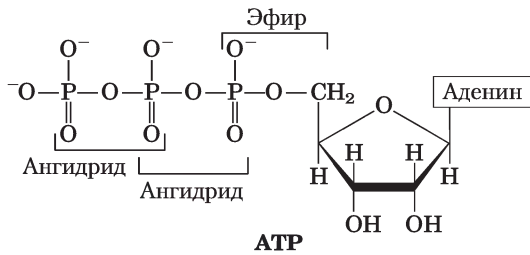


Рис. 8-37. Фосфоэфирная и фосфоангидридные связи в молекуле АТФ. При гидролизе ангидридной связи выделяется больше энергии, чем при гидролизе эфирной связи. Для сравнения показаны ангидрид карбоновой кислоты и эфир карбоновой кислоты.

пользуется аденозин-5'-трифосфат (АТФ), но в некоторых реакциях источником энергии служит УТР, GTP, или СТР. Нуклеозидтрифосфаты также используются в качестве активированных предшественников в синтезе ДНК и РНК, как описано в гл. 25 и 26.

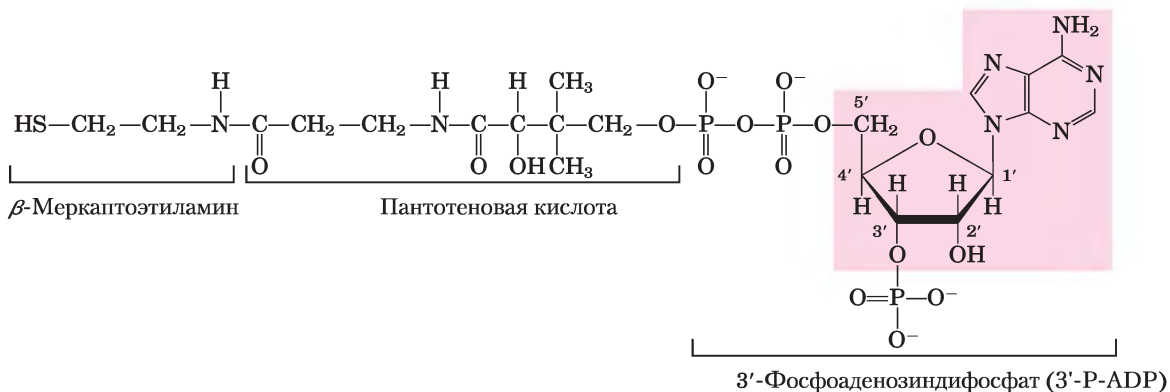
Высвобождение энергии при гидролизе АТФ и других нуклеозидтрифосфатов объясняется строением трифосфатной группы. Рибоза и α -фосфат соединены между собой простой эфирной связью. Фосфатные группы α и β , β и γ соединены между собой фосфоангидридной связью (рис. 8-37). В стандартных условиях при гидролизе эфирной связи выделяется около 14 кДж/моль энергии, в то время как при гидролизе каждой фосфоангидридной связи — около 30 кДж/моль. Гидролиз АТФ часто играет важную термодинамическую роль в процессах биосинтеза. Когда гидролиз АТФ сопряжен с реакцией, для которой $\Delta G > 0$, весь процесс движется в сторону образования продуктов благодаря гидролитическому расщеплению АТФ (вспомните связь между константой равновесия $K_{\text{равн}}$ и изменением свободной энергии ΔG (уравнение 6-3 на с. 276)).

Адениновые нуклеотиды входят в состав многих кофакторов ферментов

Аденозин входит в состав ряда кофакторов ферментов, которые участвуют в разнообразных реакциях (рис. 8-38). По своему строению они не похожи друг на друга, за исключением присутствия общего компонента — аденозина. Ни в одном из этих кофакторов аденозиновая часть молекулы не принимает непосредственного участия в реакции, но при удалении аденозина активность кофактора значительно уменьшается. Например, удаление аденинового нуклеотида (3'-фосфоаденин-

дифосфата) из ацетоацетил-СоА, производного кофермента А и ацетоацетата, уменьшает реакционную способность субстрата β -кетоацил-СоА-трансферазы (фермента, участвующего в метаболизме липидов) в 10^6 раз. Хотя точно неизвестно, зачем необходим аденозин, считается, что он влияет на энергию связывания субстрата (или кофактора) с ферментом, а значит и на катализ, вызывая стабилизацию фермент-субстратного комплекса (гл. 6). В случае β -кетоацил-СоА-трансферазы нуклеотидная часть кофермента А выполняет роль «руки», которая помогает субстрату (ацетоацетил-СоА) попасть в активный центр. Похожую функцию выполняют нуклеотидные компоненты других нуклеотидсодержащих кофакторов.

Почему в этих структурах используется аденозин, а не другая крупная молекула? Одно из объяснений основано на концепции эволюционной экономии. Аденозин, конечно же, не уникален по своим энергетическим возможностям, обеспечивающим образование связей. Важное значение аденозинтрифосфата, по-видимому, связано не столько с его какими-то необычными химическими свойствами, сколько с преимуществами использования одного соединения для выполнения многих задач. Когда-то молекула АТФ стала универсальным источником химической энергии, системы синтеза АТФ встречались чаще, чем системы синтеза других нуклеотидов; широкое распространение аденозина привело к его включению в различные молекулы. Экономия затрагивает и строение белков. Чтобы весьма разнообразные по строению и функциям ферменты могли связаться с аденозином, они должны иметь один белковый домен с определенными свойствами. Такой домен, названный **нуклеотидсвязывающим мотивом**, найден во многих ферментах, которые связывают АТФ и нуклеотидные кофакторы.



Кофермент А

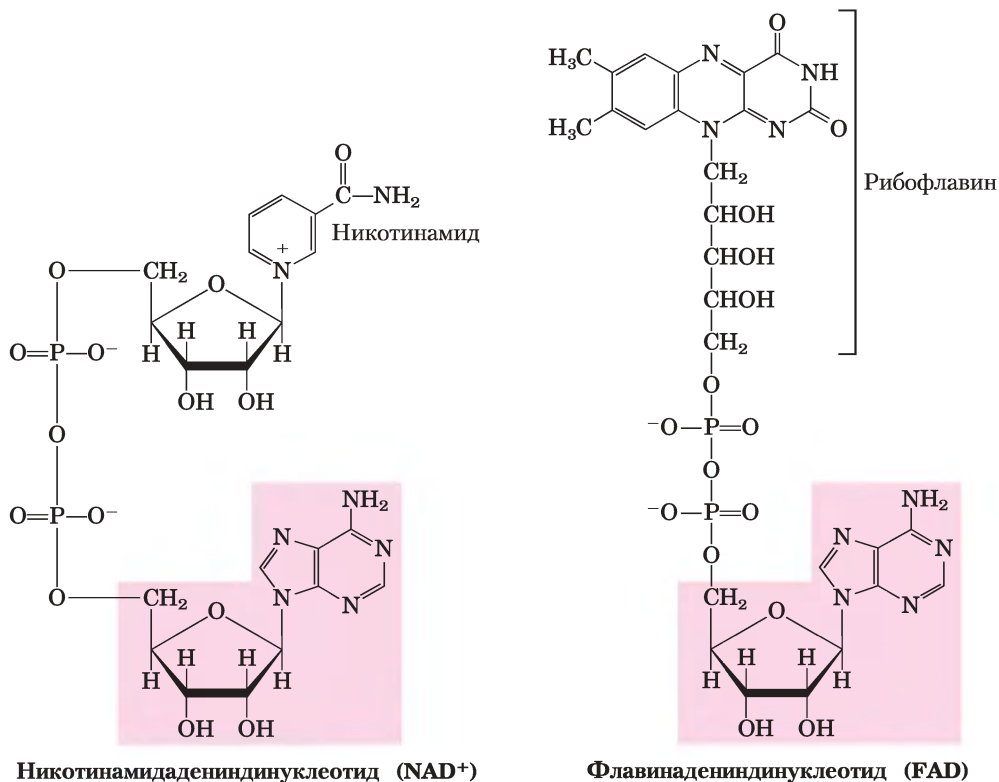
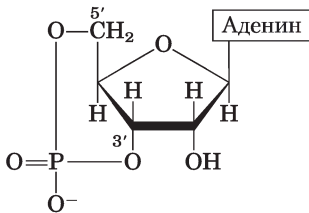


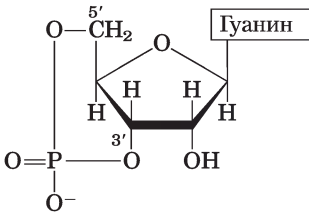
Рис. 8-38. Некоторые коферменты, в состав которых входит аденозин. Аденозиновая группа выделена розовой плашкой. Кофермент А (CoA) функционирует в качестве переносчика ацильных групп; ацильная группа (ацил или ацетоацетил) присоединяется к CoA через тиоэфирную связь с β-меркаптоэтиламинным фрагментом. NAD⁺ участвует в переносе водорода, а FAD, активная форма витамина В₂ (рибофлавин), — в переносе электронов. Другой аденозинсодержащий кофермент — это 5'-дезоксаденозилкобаламин, активная форма витамина В₁₂ (см. доп. 17-2), который участвует во внутримолекулярных перегруппировках между соседними атомами углерода.

Некоторые нуклеотиды могут быть сигнальными молекулами

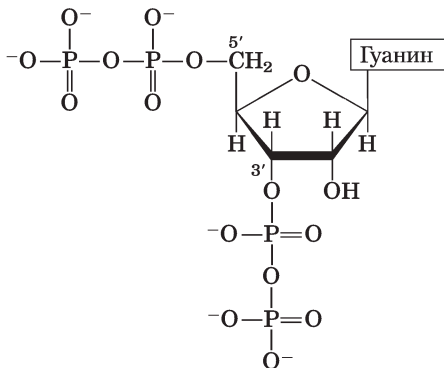
Клетки реагируют на условия окружающей среды, воспринимая сигналы от гормонов или других внешних химических раздражителей. Взаимодействие этих внеклеточных химических веществ («первичных мессенджеров») с рецепторами на поверхности клетки всегда ведет к образованию **вторичных мессенджеров** внутри клетки, которые в свою очередь приводят к адапционным изменениям внутри клетки (гл. 12). Часто роль вторичного мессенджера играет нуклеотид (рис. 8-39). Один из наиболее распространенных — это **циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (циклический АМР, сАМР)**, образующийся



Циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (циклический АМР, сАМР)



Циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат (циклический ГМР, сГМР)



Гуанозин-5'-дифосфат-3'-дифосфат (гуанозинтетрафосфат) (ppGpp)

Рис. 8-39. Три сигнальных нуклеотида.

из АТР в реакции, катализируемой аденилатциклазой — ферментом, связанным с внутренней поверхностью плазматической мембраны. Циклический АМР выполняет регуляторные функции практически в каждой клетке, кроме клеток растений. Циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат (сГМР) встречается во многих клетках, где также выполняет регуляторные функции.

Другой сигнальный нуклеотид ppGpp (рис. 8-39) образуется в клетках бактерий в ответ на снижение скорости синтеза белка в условиях нехватки аминокислот. Этот нуклеотид ингибирует синтез молекул рРНК и тРНК (см. рис. 28-24), необходимых для синтеза белков, что предотвращает ненужное образование нуклеиновых кислот.

Краткое содержание раздела 8.4 ДРУГИЕ ФУНКЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

- Молекула АТР играет центральную роль в процессах переноса химической энергии в клетках. Аденозин также может обеспечивать потребности в энергии, необходимой для образования химических связей, когда входит в состав некоторых кофакторов ферментов.
- Циклический АМР, образованный из АТР в реакции, катализируемой аденилатциклазой, служит типичным вторичным мессенджером, синтезируемым клеткой в ответ на гормоны и другие внешние химические сигналы.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

3'-конец 396	Матричная РНК (мРНК) 391
5'-конец 396	Моноцистронная мРНК 408
А-форма ДНК 405	Мутация 415
В-форма ДНК 405	Нуклеозид 392
Z-форма ДНК 405	Нуклеотид 392
Большая бороздка 401	Олигонуклеотид 397
Вторичный мессенджер 427	Палиндром 405
Ген 391	Пары оснований 399
Дезоксирибонуклеотиды 393	Пиримидин 392
Крест 406	Полинуклеотид 397
Малая бороздка 401	

Полицистронная мРНК 408	Фосфодиэфирная связь 396
Пурип 392	Циклический 3',5'-аденозинмонофосфат (циклический АМР, сАМР) 427
Рибонуклеотид 393	Четырехцепочечная ДНК из G 407
Рибосомная РНК (рРНК) 391	Шпилька 406
Транскрипция 408	
Транспортная РНК (тРНК) 391	
Трехцепочечная ДНК 406	

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая литература

Chang, K.Y. & Varani, G. (1997) Nucleic acids structure and recognition. *Nat. Struct. Biol.* 4 (Suppl.), 854–858.

Описано применение ЯМР для определения структуры нуклеиновых кислот.

Friedberg, E.C., Walker, G.C., & Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*, W.H. Freeman and Company, New York.

Хороший источник информации о химии нуклеотидов и нуклеиновых кислот.

Hecht, S.M. (ed.) (1996) *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*, Oxford University Press, Oxford.

Очень полезная подборка статей.

Kornberg, A. & Baker, T.A. (1991) *DNA Replication*, 2nd edn, W.H. Freeman and Company, New York.

Лучшая книга для того, чтобы расширить свои знания о структуре ДНК.

История

Judson, H.F. (1996) *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology*, expanded edn, Cold Spring Harbor, NY.

Olby, R.C. (1994) *The Path to the Double Helix: The Discovery of DNA*, Dover Publications, Inc., New York.

Sayre, A. (1978) *Rosalind Franklin and DNA*, W. W. Norton & Co., Inc., New York.

Watson, J.D. (1968) *The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA*, Atheneum, New York. [Карманное издание, Touchstone Books, 2001.]

Различные структуры ДНК

Frank-Kamenetskii, M.D. & Mirkin, S.M. (1995) Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 65–95.

Herbert, A. & Rich, A. (1996) The biology of left-handed Z-DNA. *J. Biol. Chem.* 271, 11595–11598.

Htun, Y. & Dahlberg, J.E. (1989) Topology and formation of triple-stranded H-DNA. *Science* 243, 1571–1576.

Keniry, M.A. (2000) Quadruplex structures in nucleic acids. *Biopolymers* 56, 123–146.

Хорошее обобщение свойств четырехцепочечных структур ДНК.

Moore, P.V. (1999) Structural motif in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 287–300.

Shafer, R.H. (1998) Stability and structure of model DNA triplexes and quadruplexes and their interactions with small ligands. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 59, 55–94.

Химия нуклеиновых кислот

Bonetta, L. (2006) Genome sequencing in the fast lane. *Nat. Methods* 3, 141–147.

Технологии самого быстрого и мощного секвенирования ДНК.

Collins, A.R. (1999) Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21, 238–246.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., & Lunt J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17, 1195–1214.

Marnett, L.J. & Plastaras, J.P. (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* 17, 214–221.

АТФ — переносчик энергии

Jencks, W.P. (1987) Economics of enzyme catalysis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 65–73.

Краткая, но очень интересная статья.

Вопросы и задачи

1. Строение нуклеотидов. Какие атомы пуринового цикла в пуриновом нуклеотиде ДНК могут образовывать водородные связи, но не участвуют в образовании уотсон-криковских пар?

2. Последовательность комплементарных цепей ДНК. Известна одна цепь двойной спирали ДНК, которая имеет последовательность (5')GCGCAATATTTCTCAAAATATTTGCGC(3'). Напишите последовательность нуклеотидов в комплементарной цепи. Что особенного в последовательности этого сегмента ДНК? Может ли эта двуцепочечная ДНК образовывать разные вторичные структуры?

3. ДНК в теле человека. Вычислите массу двойной спирали ДНК в граммах, если ее длина равна расстоянию от Земли до Луны (~320 000 км). Масса ДНК длиной 1000 пар нуклеотидов $\sim 1 \cdot 10^{-18}$ г; расстояние между двумя соседними парами оснований составляет 3,4 Å. Для информации, в вашем теле содержится примерно 0,5 г ДНК.

4. Изгибы молекул ДНК. Предположим, что последовательность poly(A) из пяти оснований в цепи ДНК образует изгиб с углом 20°. Вычислите полный угол, на который отклонится цепь

ДНК, если центральные пары оснований (третьи из пяти) в двух последовательностях $(dA)_5$ будут находиться на расстоянии: а) 10 пар нуклеотидов; б) 15 пар нуклеотидов. Учтите, что на один полный виток двойной спирали ДНК приходится 10 пар оснований.

5. Различия между структурами ДНК и РНК.

Шпильки могут образовываться в местах палиндромных последовательностей либо в одной цепи РНК, либо в одной цепи ДНК. Чем спиральная структура длинной и полностью комплементарной (кроме конца) шпильки в РНК отличается от похожей шпильки в ДНК?

6. Химия нуклеотидов. Клетки большинства эукариотических организмов имеют высокоспециализированную систему, которая точно распознает G–T-несоответствия в ДНК. Такая неправильная пара оснований исправляется на пару G≡C (не A=T). Этот механизм исправления неправильной G–T-пары дублирует более общую систему, которая исправляет практически все ошибки. Предположите, зачем клетке может потребоваться дополнительная специализированная система исправления G-T ошибок.

7. Спонтанные повреждения ДНК. При гидролизе N-гликозидной связи между дезоксирибозой и пурином в ДНК возникает AP-сайт. В результате происходит дестабилизация ДНК, которая сильнее, чем при любом случае аномального спаривания. Это явление пока не до конца понятно. Изучите структуру AP-сайта (см. рис. 8-33, б) и опишите несколько химических последствий потери основания.

8. Структура нуклеиновых кислот. Объясните, почему увеличивается поглощение УФ-света двойной спиралью ДНК (гиперхромный эффект) при ее денатурации.

9. Определение концентрации белка в растворе, содержащем белки и нуклеиновые кислоты.

Концентрация белка или нуклеиновой кислоты в растворе, содержащем оба полимера, может быть определена на основании различия в их спектральных характеристиках: максимум поглощения белков находится при 280 нм, а нуклеиновых кислот — при 260 нм. Если измерить поглощение

А при 280 и 260 нм, по отношению поглощения в этих областях, которое обозначают $R_{280/260}$, по таблице, приведенной ниже, находят множитель F и массовую долю всех нуклеиновых кислот в растворе. Концентрация белка (в мг/мл) равна $F \cdot A_{280}$ (для кюветы с длиной оптического пути 1 см). Вычислите концентрацию белка в растворе с поглощением $A_{280} = 0,69$ и $A_{260} = 0,94$.

$R_{280/260}$	Содержание нуклеиновых кислот (%)	F
1,75	0,00	1,116
1,63	0,25	1,081
1,52	0,50	1,054
1,40	0,75	1,023
1,36	1,00	0,994
1,30	1,25	0,970
1,25	1,50	0,944
1,16	2,00	0,899
1,09	2,50	0,852
1,03	3,00	0,814
0,979	3,50	0,776
0,939	4,00	0,743
0,874	5,00	0,682
0,846	5,50	0,656
0,822	6,00	0,632
0,804	6,50	0,607
0,784	7,00	0,585
0,767	7,50	0,565
0,753	8,00	0,545
0,730	9,00	0,508
0,705	10,00	0,478
0,671	12,00	0,422
0,644	14,00	0,377
0,615	17,00	0,322
0,595	20,00	0,278

10. Растворимость компонентов ДНК. Напишите формулы следующих соединений и сравните их растворимость в воде: дезоксирибоза, гуанин, фосфат. Как растворимость этих веществ соотносится с трехмерной структурой двойной спирали ДНК?

11. Секвенирование ДНК по Сенгеру. В методе секвенирования ДНК по Сенгеру (дидезокси-метод) небольшое количество дидезоксинуклеотидтрифосфата (скажем, ddCTP) добавляют в реакционную смесь наряду с гораздо большим количеством соответствующего дезоксинуклеотидтрифосфата (в данном случае dCTP). Каков был бы результат реакции при отсутствии в смеси dCTP?

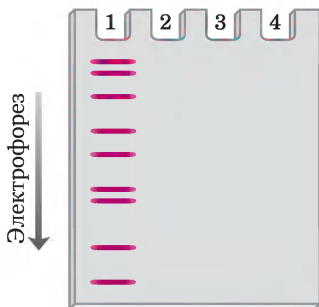
12. Секвенирование ДНК. По методу Сенгера был секвенирован следующий фрагмент ДНК. Красная точка обозначает флуоресцентную метку.



Образец ДНК инкубировали с ДНК-полимеразой и каждой из смесей нуклеотидов (в соответствующем буфере), приведенных ниже. Дидезокси-нуклеотиды (ddNTP) были добавлены в относительно небольших количествах.

1. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddTTP
2. dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ddGTP
3. dATP, dCTP, dGTP, ddTTP
4. dATP, dTTP, dCTP, dGTP

Полученные молекулы ДНК были разделены электрофорезом в агарозном геле и идентифицированы места расположения флуоресцентных полосок. Картина электрофореза, полученная при разделении смеси 1, показана ниже. Учитывая, что все остальные смеси разделяли в этом же геле, укажите, где расположены остальные полосы?



13. Фосфодиэстераза из змеиного яда. Фермент экзонуклеаза последовательно отщепляет нуклеотиды с конца полинуклеотидной цепи. Фосфодиэстераза из яда змей, которая гидролизует нуклеотиды с 3'-конца любого олигонуклеотида, содержащего свободную 3'-гидроксильную группу, разрезает связь между 3'-гидроксильной группой рибозы или дезоксирибозы и фосфатной группой следующего нуклеотида. Ее действию подвергаются одноцепочечные молекулы ДНК или РНК; она не имеет специфичности по основаниям. Этот фермент использовался для определения последовательности до того, как были разработаны современные методы секвенирования нуклеиновых кислот. Какие продукты образуются при частичной обработке фосфодиэстера-

зой из яда змей олигонуклеотида со следующей последовательностью?



14. Сохранение ДНК в эндоспорах бактерий. Бактериальные эндоспоры образуются, когда условия окружающей среды не способствуют активному клеточному метаболизму. У почвенной бактерии *Bacillus subtilis*, например, процесс спорообразования начинается, если недостает хотя бы одного из необходимых питательных веществ. В результате образуется маленькая, метаболически неактивная структура, которая может жить практически неограниченное время с минимальным уровнем метаболизма. Споры используют механизм для предотвращения накопления потенциально летальных мутаций в их ДНК за периоды покоя, которые могут превышать тысячи лет. Споры *B. subtilis* более устойчивы к действию радиации и мутагенных окислителей, чем растущие клетки.

а) Одним из факторов, которые предотвращают повреждение ДНК в спорах, является значительное уменьшение содержания воды. Как этот фактор может повлиять на некоторые мутации?

б) Эндоспоры содержат класс белков, которые называются небольшими кислоторастворимыми белками (от англ. *small acid-soluble proteins*, *SASP*); они связываются с ДНК, что предотвращает образование циклобутановых димеров. Что вызывает образование димеров и почему эндоспоры бактерий должны иметь механизм, предотвращающий их образование?

15. Синтез олигонуклеотидов. В схеме на рис. 8-35 каждое следующее основание, добавляемое к растущей олигонуклеотидной цепи, модифицировано таким образом, что его 3'-гидроксильная группа активирована, а к 5'-гидроксильной группе присоединена диметокситритильная группа (DMT). Какова функция диметокситритильной группы?

Биохимия в Интернете

16. Структура ДНК. Открытие пространственной структуры ДНК помогло понять, как эта молекула безошибочно передает информацию от одного поколения к следующему. Вы можете увидеть вто-

ричную структуру двойной спирали ДНК на веб-сайте банка данных белковых структур, *Protein Data Bank*, PDB (www.rcsb.org/pdb). Используйте идентификаторы PDB, список которых приведен ниже, для того чтобы найти данные для двух форм ДНК. Используя программы *RasMol* или *Chime*, с помощью различных опций для просмотра выполните следующие упражнения.

а) Найдите файл 141D для высококонсервативной повторяющейся последовательности ДНК с конца генома ВИЧ-1 (вирус, который вызывает СПИД). Изобразите структуру молекулы в виде палочек, или шаростержневой модели (в меню контроля выберите **Select > All**, затем **Render > Scheme > Ball and Stick**). Укажите положение сахаро-фосфатного остова для каждой цепи ДНК. Найдите месторасположение и определите тип отдельных оснований. Какой из концов — 5'-конец? Покажите большую и малую бороздки. Какая это спираль — правозакрученная или левозакрученная?

б) Откройте файл 145D, ДНК в Z-конформации. Изобразите структуру молекулы в виде палочек или шаростержневую модель. Покажите большую и малую бороздки. Какая это спираль — правозакрученная или левозакрученная?

в) Для того чтобы полностью разобраться во вторичной структуре ДНК, посмотрите на стереоизображение молекулы. В меню контроля выберите **Select > All**, затем **Render > Stereographic > Cross-eyed** или **Wall-eyed**. Вы увидите два изображения молекулы ДНК. Сядьте так, чтобы ваше лицо находилось на расстоянии примерно 25 см от монитора, и сфокусируйте взгляд на кончике носа (cross-eyed) или на противоположном крае экрана (wall-eyed). На заднем плане вам должно быть видно три изображения спирали ДНК. Переведите взгляд с кончика носа на центральное изображение, которое должно быть трехмерным. (Учтите, что так умеет делать только один из двух авторов этого учебника.)

Анализ экспериментальных данных —

17. Исследования структуры ДНК, проведенные Чаргаффом. В разделе «ДНК — это двойная спираль, хранящая генетическую информацию» приводятся некоторые основные заключения Эрвина Чаргаффа, сформулированные в виде четырех правил («Правила Чаргаффа»). В данной за-

даче мы рассмотрим те данные, которые Чаргафф привел в подтверждение своих выводов. В одной работе (1950 г.) он описал свой метод анализа и представил несколько первых результатов. Если говорить коротко, он обрабатывал образцы ДНК кислотой, чтобы удалить основания, разделял основания с помощью бумажной хроматографии и измерял количество каждого основания с помощью УФ-спектроскопии. Полученные результаты представлены ниже в трех таблицах. *Молярное отношение* — это отношение числа молей каждого основания в образце к числу молей фосфата в этом образце (эта цифра показывает, какую долю от общего числа оснований составляет данное основание). *Выход* — это сумма всех четырех оснований (сумма молярных отношений); сумма всех оснований в ДНК должна составлять единицу.

Молярное отношение в ДНК быка

Основание	Тимус			Селезенка		Печень
	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Образец 1	Образец 2	Образец 1
Аденин	0,26	0,28	0,30	0,25	0,26	0,26
Гуанин	0,21	0,24	0,22	0,20	0,21	0,20
Цитозин	0,16	0,18	0,17	0,15	0,17	
Тимин	0,25	0,24	0,25	0,24	0,24	
<i>Выход</i>	<i>0,88</i>	<i>0,94</i>	<i>0,94</i>	<i>0,84</i>	<i>0,88</i>	

Молярное отношение в ДНК человека

Основание	Сперма		Тимус	Печень	
	Образец 1	Образец 2	Образец 1	Норма	Карцинома
Аденин	0,29	0,27	0,28	0,27	0,27
Гуанин	0,18	0,17	0,19	0,19	0,18
Цитозин	0,18	0,18	0,16		0,15
Тимин	0,31	0,30	0,28		0,27
<i>Выход</i>	<i>0,96</i>	<i>0,92</i>	<i>0,91</i>		<i>0,87</i>

Молярное отношение в ДНК микроорганизмов

Основание	Дрожжи		Бацилла туберкулеза птиц
	Образец 1	Образец 2	Образец 3
Аденин	0,24	0,30	0,12
Гуанин	0,14	0,18	0,28
Цитозин	0,13	0,15	0,26
Тимин	0,25	0,29	0,11
<i>Выход</i>	<i>0,76</i>	<i>0,92</i>	<i>0,77</i>

а) На основании этих данных Чаргафф заключил, что «не обнаружено различий состава

ДНК в исследованных до сих пор образцах из разных тканей организма одного и того же вида». Это соответствует заключению 2 (разд. 8.2, с. 400). Однако скептик, разглядывающий приведенные выше данные, определенно мог бы сказать, что для него они, безусловно, имеют отличия. Если бы вы были Чаргаффом, как бы вы на основании этих данных могли убедить скептика изменить свое мнение?

б) Состав оснований ДНК в нормальной и раковой (клетке гепатокарциномы) клетках печени практически одинаков. Как вы думаете, мог ли метод, использованный Чаргаффом, позволить найти различия ДНК в нормальной и раковой клетках? Объясните свой ответ. Как можно было ожидать, результаты Чаргаффа не были абсолютно убедительными. Он усовершенствовал свой метод и описал это в следующей работе (1951 г.), в которой привел молярные отношения для оснований ДНК из различных организмов:

Источник	A:G	T:C	A:T	G:C	Пурин:пиримидин
Бык	1,29	1,43	1,04	1,00	1,1
Человек	1,56	1,75	1,00	1,00	1,0
Курица	1,45	1,29	1,06	0,91	0,99
Лосось	1,43	1,43	1,02	1,02	1,02
Пшеница	1,22	1,18	1,00	0,97	0,99
Дрожжи	1,67	1,92	1,03	1,20	1,0
<i>Haemophilus influenzae</i> тип с	1,74	1,54	1,07	0,91	1,0
<i>E. coli</i> K-12	1,05	0,95	1,09	0,99	1,0
Бацилла туберкулеза птиц	0,4	0,4	1,09	1,08	1,1
<i>Serratia marcescens</i>	0,7	0,7	0,95	0,86	0,9
<i>Bacillus schatz</i>	0,7	0,6	1,12	0,89	1,0

в) Согласно Чаргаффу, как сказано в заключении 1, состав оснований ДНК у различных видов организмов сильно различается. Подтвердите это утверждение на основании приведенных выше данных.

г) В соответствии с выводом 4 (см. с. 400), в ДНК *любой* клетки независимо от вида $A + G = T + C$. Подтвердите это, используя представленные выше данные.

Чаргафф проводил свои эксперименты в основном, чтобы опровергнуть тетра-нуклеотидную гипотезу строения ДНК, согласно которой ДНК является монотонным тетра-нуклеотидным полимером состава $(AGCT)_n$, последовательность которого, естественно, не может нести в себе никакой информации. Хотя представленные выше данные показывают, что ДНК вовсе не простой тетра-нуклеотид (в противном случае все образцы имели бы одинаковые молярные отношения 0,25 для всех оснований), однако сохраняется возможность, что ДНК в разных организмах представляет собой более сложную, но все же монотонно повторяющуюся последовательность. Для решения этого вопроса Чаргафф взял ДНК из проростков пшеницы и обрабатывал ее ферментом дезоксирибонуклеазой в течение разных промежутков времени. Через каждый промежуток времени некоторая доля ДНК «разваливалась» на мелкие фрагменты. Оставшиеся более крупные фрагменты Чаргафф назвал «ядром». В таблице в столбце «19% ядра» представлено относительное количество оснований, присутствующих в более крупных фрагментах, оставшихся после деградации 81% ДНК; в столбце «8% ядра» представлено относительное количество оснований, присутствующих в более крупных фрагментах, оставшихся после деградации 92% ДНК.

Основание	Интактная ДНК	19% ядра	8% ядра
Аденин	0,27	0,33	0,35
Гуанин	0,22	0,20	0,20
Цитозин	0,22	0,16	0,14
Тимин	0,27	0,26	0,23
<i>Выход</i>	<i>0,98</i>	<i>0,95</i>	<i>0,92</i>

д) Как на основании этих данных доказать, что ДНК зародышей пшеницы не является монотонным повторением определенной последовательности?

Литература

Chargaff, E. (1950) Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymic degradation. *Experientia* **6**, 201–209.

Chargaff, E. (1951) Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.* **10**, 654–659.

Из всех природных систем живая материя является единственной, которая, несмотря на огромные преобразования, хранит в своей структуре самую обширную информацию о собственном прошлом.

Эмиль Цукеркандл и Лайнус Полинг,
статья в Journal of Theoretical Biology, 1965

9

Технологии на основе информации из ДНК

9.1. Клонирование ДНК:

основные понятия 434

9.2. От генов к геномам 449

9.3. От геномов к протеомам 461

9.4. Изменения генома и новые продукты биотехнологии 469

Обратимся к рассмотрению методов, разработка и развитие которых определяющим образом повлияли на гигантские успехи биологических наук и на нынешние и будущие рубежи биохимии. В основе этих методов лежат важные теоретические принципы. Объяснение закономерностей протекания реакций ферментативного катализа, расшифровка структур многих биомолекул, установление механизмов клеточного метаболизма и передачи информации — все это все это сильно продвинуло исследования сложных биохимических процессов, происходящих в живой природе. Клеточное деление, иммунитет, эмбриогенез, зрение, вкус, онтогенез, познавательная способность — все эти гармоничные процессы про-

текают в сопровождении искусно организованного оркестра молекулярных и макромолекулярных взаимодействий, которые мы теперь начинаем понимать все более отчетливо. В длительном биохимическом путешествии, начатом еще в XIX в., мы достигли наконец реальной возможности осуществлять все более сложные и трудные исследования живых систем, вплоть до их изменения.

Для того чтобы понять сложный биохимический процесс, биохимик выделяет его и исследует отдельные компоненты *in vitro*, а затем соединяет их вместе, получая согласованную картину всего процесса в целом. Основным источником понимания молекулярной сути биохимического процесса является собственный информационный архив клетки, ее ДНК. Однако истинный размер хромосом создает гигантскую проблему: как найти и изучить отдельный ген среди десятка тысяч генов, включающих миллиарды пар оснований генома млекопитающих? Решения стали появляться в 1970-х гг.

Десятилетия упорного труда тысяч ученых — генетиков, биохимиков, клеточных биологов и физхимиков — достигли кульминации в лаборато-



Пол Берг



Герберт Бойер



Стенли Н. Коэн

риях Пола Берга, Герберта Бойера и Стенли Коэна, разработавших методы обнаружения, очистки, приготовления и изучения малых сегментов ДНК, полученных из намного превышающих их по размерам хромосом. Методы клонирования ДНК проложили дорогу к таким современным областям, как **геномика** и **протеомика**, исследования генов и белков в масштабах целых клеток и организмов. Эти новые методы повлияли на фундаментальные исследования, сельское хозяйство, медицину, экологию, судебную медицину и многие другие области, иногда ставя общество перед трудным выбором и этическими дилеммами.

Начнем эту главу с наиболее общего изложения фундаментальных биохимических принципов теперь уже классической методики клонирования ДНК, затем, после создания основы для обсуждения геномики, проиллюстрируем ряд применений и возможностей этих технологий, с основным акцентом на современные достижения в геномике и протеомике.

9.1. Клонирование ДНК: основные понятия

Клон — это идентичная копия. Этот термин первоначально употреблялся для клеток одного типа, выделенных и способных к воспроизводству с целью создания популяции идентичных клеток. **Клонирование ДНК** включает выделение специфического гена или сегмента ДНК из хромосомы, присоединение его к малой молекуле-носителю ДНК, а затем копирование этой модифицированной ДНК тысячи или миллионы раз, посредством как увеличения числа клеток, так и создания множественных копий клонируемой ДНК в каждой клетке. В результате достигается избирательная амплификация данного гена или сегмента ДНК. Клонирование ДНК любого организма включает пять основных процедур:

1. *Вырезание ДНК в точных позициях.* Роль молекулярных «ножниц» выполняют сайт-специфичные эндонуклеазы (эндонуклеазы рестрикции).
2. *Выбор малой молекулы ДНК, способной к саморепликации.* Эти ДНК называют **клонирующими векторами** (вектор — фактор доставки); обычно это плазмиды или вирусные ДНК.
3. *Ковалентное соединение двух фрагментов ДНК.* Фермент ДНК-лигаза сшивает кло-

нирующий вектор с ДНК, которую надо клонировать. Смешанную молекулу ДНК, содержащую ковалентно связанные сегменты из двух или более источников, называют **рекомбинантной ДНК**.

4. *Перемещение рекомбинантной ДНК из пробирки в клетку-хозяина,* предоставляющую ферментативный аппарат репликации ДНК.
5. *Отбор или идентификация клеток-хозяев, содержащих рекомбинантную ДНК.*

Набор методов, используемых для выполнения этих и подобных процедур, называют **технологией рекомбинантных ДНК** или, более неформально, **генной инженерией**.

Большая часть нашего начального изложения будет сфокусирована на клонировании ДНК в бактерии *Escherichia coli*, первом организме, использованном для работы с рекомбинантными ДНК и до сих пор наиболее распространенной клеткой-хозяином. У *E. coli* есть много преимуществ: метаболизм ее ДНК (как и многих других ее биохимических процессов) хорошо изучен; многие имеющиеся в природе клонирующие векторы, связанные с *E. coli*, такие как плазмиды и бактериофаги (бактериальные вирусы; их часто называют просто фагами), хорошо охарактеризованы; имеются методики быстрого переноса ДНК из одной бактериальной клетки в другую. Мы также обратимся к клонированию ДНК в других организмах; эта тема более полно обсуждается ниже.

Эндонуклеазы рестрикции и ДНК-лигаза создают рекомбинантную ДНК

Очень важным для технологии рекомбинантной ДНК является набор ферментов (табл. 9-1), ставших доступными после десятилетий исследований метаболизма нуклеиновых кислот. Два класса ферментов лежат в основе подхода к созданию и «размножению» молекулы рекомбинантной ДНК (**рис. 9-1**). Во-первых, **эндонуклеазы рестрикции** (рестриктазы) распознают и разрезают ДНК в местах специфических нуклеотидных последовательностей (нуклеотидные последовательности распознавания или сайты рестрикции), создавая набор более мелких фрагментов. Во-вторых, клонируемый фрагмент ДНК может быть встроен в подходящий клонирующий вектор с использованием **ДНК-лигазы** для соединения молекул ДНК.

Таблица 9-1 Некоторые ферменты, используемые в технологии рекомбинантных ДНК

Фермент(ы)	Функция
Эндонуклеазы рестрикции типа II	Разрезают ДНК в местах специфической последовательности оснований
ДНК-лигаза	Соединяет две молекулы или фрагмента ДНК
ДНК-полимераза I (<i>E. coli</i>)	Заполняет пробелы в дуплексах, поэтапно добавляя нуклеотиды к 3'-концам
Обратная транскриптаза	Создает ДНК-копию молекулы РНК
Полинуклеотидкиназа	Присоединяет фосфат к 5'-ОН-концу полинуклеотида, помечая его или осуществляя сшивание
Терминальная трансфераза	Добавляет гомополимерные «хвосты» к 3'-ОН концам линейного дуплекса
Эксонуклеаза III	Отщепляет нуклеотидные остатки с 3'-концов цепи ДНК
Эксонуклеаза бактериофага λ	Отщепляет нуклеотиды с 5'-концов дуплекса, оставляя одноцепочечные 3'-концы
Щелочная фосфатаза	Отщепляет терминальные фосфаты или с 5'-, или с 3'-конца (или с обоих)

Затем рекомбинантный вектор вводится в клетку-хозяина, которая размножает фрагмент в ходе множества стадий клеточного деления.

Эндонуклеазы рестрикции обнаружены у самых разнообразных бактерий. В начале 1960-х гг. Вернер Арбер открыл, что биологическая функция рестриктаз состоит в распознавании и разрезании чужеродных ДНК (например, ДНК инфицирующих вирусов), при этом говорят, что такие ДНК рестриктируются. В ДНК клетки-хозяина последовательность оснований, которая распознается ее собственной эндонуклеазой рестрикции, защищена от расщепления метилированием ДНК, катализируемом специфичной ДНК-метилазой. Эндонуклеаза рестрикции и соответствующая метилаза иногда называются системой рестрикции-модификации.

Известно три типа эндонуклеаз рестрикции: I, II и III. Рестриктазы I и III типа обычно представляют собой большие, мультисубъединичные комплексы, обладающие как эндонуклеазной, так и метилазной активностью. Эндонуклеазы ре-

Рис. 9-1. Схема клонирования ДНК. Клонировующий вектор и эукариотические хромосомы независимо друг от друга разрезаются одной и той же эндонуклеазой рестрикции. Затем фрагменты, которые надо клонировать, встраиваются в клонировующий вектор. Получившаяся рекомбинантная ДНК (показан только один рекомбинантный вектор) встраивается в клетку-хозяина, где она размножается (клонировается). *Внимание!* Масштаб не сохранен: по размеру хромосома *E. coli* намного больше по сравнению с типичным клонировующим вектором (таким как плаزمид).

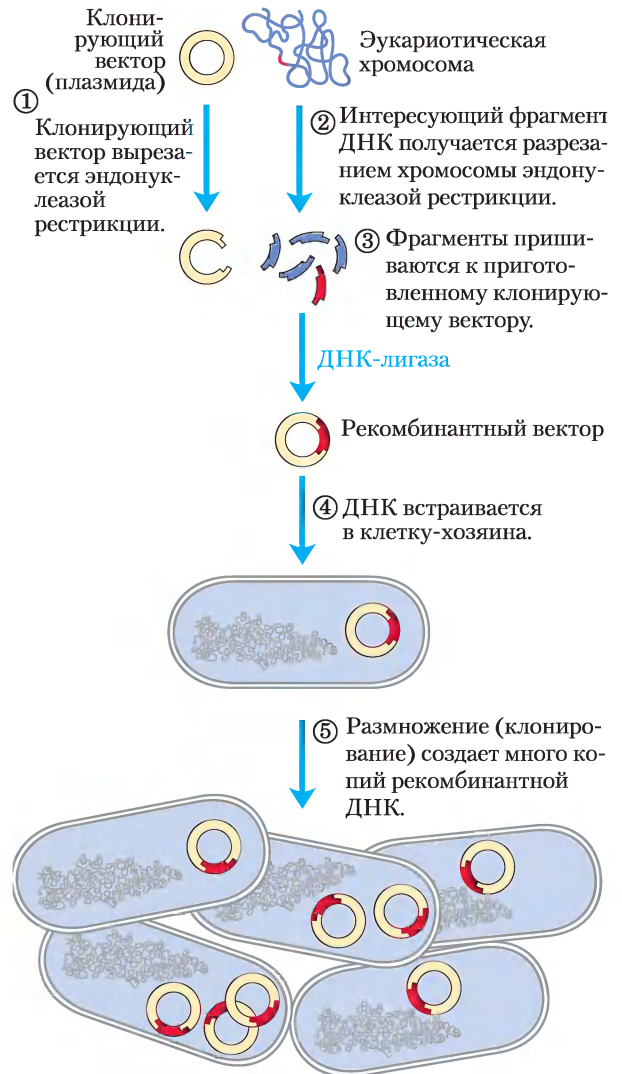


Таблица 9-2 Нуклеотидные последовательности, распознаваемые некоторыми эндонуклеазами рестрикции II типа

<i>Bam</i> HI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{G G A T C C} (3') \\ \text{C C T A G G} \\ \uparrow \\ * \end{array}$	<i>Hind</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{A A G C T T} (3') \\ \text{T T C G A A} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Cla</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{A T C G A T} (3') \\ \text{T A G C T A} \\ \uparrow \\ * \end{array}$	<i>Not</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{G C G G C C G C} (3') \\ \text{C G C C G G C G} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Eco</i> RI	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{G A A T T C} (3') \\ \text{C T T A A G} \\ \uparrow \\ * \end{array}$	<i>Pst</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{C T G C A G} (3') \\ \text{G A C G T C} \\ \uparrow \\ * \end{array}$
<i>Eco</i> RV	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{G A T A T C} (3') \\ \text{C T A T A G} \\ \uparrow \end{array}$	<i>Pvu</i> II	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{C A G C T G} (3') \\ \text{G T C G A C} \\ \uparrow \end{array}$
<i>Hae</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow * \\ (5') \text{G G C C} (3') \\ \text{C C G G} \\ * \uparrow \end{array}$	<i>Tth</i> 111I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ (5') \text{G A C N N N G T C} (3') \\ \text{C T G N N N C A G} \\ \uparrow \end{array}$

Стрелками указаны фосфодиэфирные связи, расщепляемые каждой эндонуклеазой рестрикции; звездочки — основания, которые метилируются соответствующей метилазой (где это известно); N — произвольное основание. Обратите внимание, что название каждого фермента состоит из трехбуквенной аббревиатуры (написано курсивом) бактериального вида, из которого он получен, за которой иногда следует обозначение штамма и римские цифры (чтобы не путать различные эндонуклеазы рестрикции, выделенные из одних и тех же бактериальных видов). Так, надпись *Bam*HI означает, что это первая (I) эндонуклеаза рестрикции, полученная из штамма H бактерии *Bacillus amyloliquefaciens*.

стрикции I типа разрезают ДНК в произвольном месте, которое может быть удалено более чем на 1000 пар оснований (1000 п. н.) от распознаваемой последовательности нуклеотидов. Эндонуклеазы рестрикции III типа разрезают ДНК примерно на расстоянии 25 п. н. от распознаваемой нуклеотидной последовательности. Рестриктазы I и III типов двигаются вдоль ДНК благодаря реакции, которая требует энергии АТФ. Эндонуклеазы рестрикции II типа, впервые полученные Хамилтоном Смитом в 1970 г., удобнее, поскольку не требуют АТФ и разрезают ДНК в пределах самой распознаваемой нуклеотидной последовательности. Исключительное удобство этой группы эндонуклеаз рестрикции было продемонстрировано Даниэлем Натансоном, который впервые использовал их для разработки новых методов картирования и исследования генов и геномов.

У различных видов бактерий были открыты тысячи эндонуклеаз рестрикции, причем один или несколько таких ферментов распознают бо-

лее 100 различных последовательностей ДНК. Распознаваемые нуклеотидные последовательности обычно от 4 до 6 п. н. в длину и представляют собой палиндромы (см. рис. 8-18). В табл. 9-2 приведены последовательности оснований, распознаваемые некоторыми эндонуклеазами рестрикции типа II. В некоторых случаях взаимодействие между эндонуклеазой рестрикции и ее распознаваемой нуклеотидной последовательностью подробно объяснено на молекулярном уровне; например, в табл. 9-2 изображены последовательности, узнаваемые несколькими эндонуклеазами рестрикции типа II.

Некоторые эндонуклеазы рестрикции создают в двух цепях ДНК разрывы с уступом, оставляя от двух до четырех нуклеотидов одной цепи неспаренными на каждом получающемся конце. Эти неспаренные цепи называются «липкими» концами (рис. 9-2, а), потому что они могут комплементарно связаться друг с другом или с комплементарными «липкими» концами фрагментов

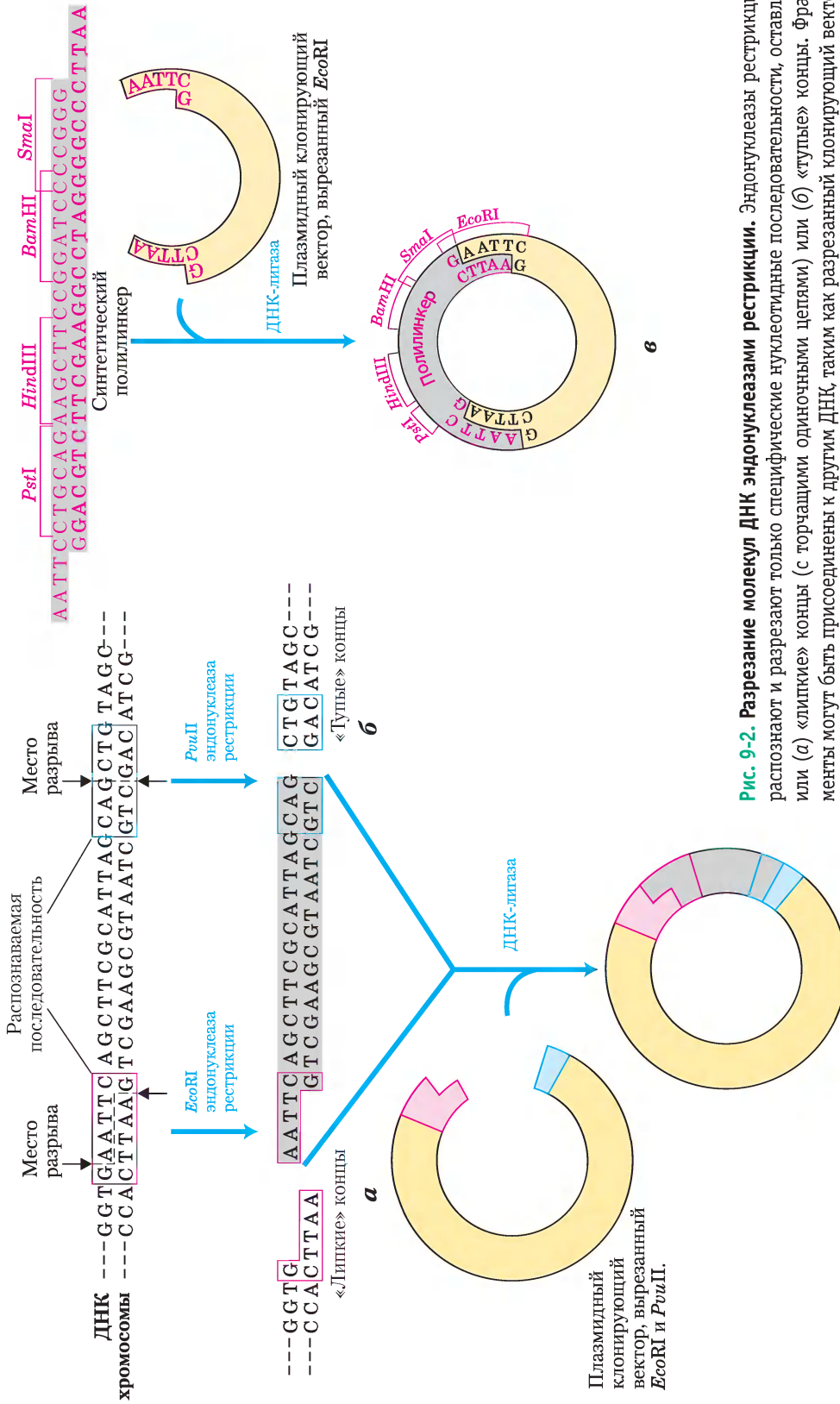


Рис. 9-2. Разрезание молекулы ДНК эндонуклеазами рестрикции. Эндонуклеазы рестрикции распознают и разрезают только специфические нуклеотидные последовательности, оставляя или (а) «липкие» концы (с торчащими одиночными цепями) или (б) «тупые» концы. Фрагменты могут быть присоединены к другим ДНК, таким как разрезанный клонирующий вектор (плазмида), показанный здесь. Этой реакции способствует гибридизация комплементарных «липких» концов. Присоединение (лигирование) менее эффективно для фрагментов ДНК с «тупыми» концами, чем с комплементарными «липкими», а фрагменты ДНК с разными (некомплементарными) «липкими» концами обычно вообще не лигируются. (в) В плазмиду, разрезанную рестриктазой, может быть встроено синтетический фрагмент ДНК с последовательностями, которые узнают несколько эндонуклеаз рестрикции. Вставка с одним сайтом рестрикции называется линкером, а с несколькими участками — полилинкером. **Эндонуклеазы рестрикции**

других ДНК. Другие эндонуклеазы рестрикции разрезают обе цепи ДНК в противоположных фосфодиэфирных связях, не оставляя неспаренных оснований на концах, такие концы часто называют «**тупыми**» (рис. 9-2, б).

Средний размер фрагментов ДНК, полученных в результате разрезания геномной ДНК эндонуклеазой рестрикции, зависит от частоты, с которой специфический участок рестрикции встречается в молекуле ДНК, что, в свою очередь, во многом обусловлено размером распознаваемой последовательности. В молекуле ДНК с произвольной нуклеотидной последовательностью, в которой все четыре основания присутствуют в равных количествах, последовательность, состоящая из 6 п. н., распознаваемая такой эндонуклеазой рестрикции, как *Vam*HI, встречалась бы в среднем один раз на каждые 4^6 (4096) п. н., если предположить, что ДНК содержит 50% G=C-пар. Ферменты, которые распознают последовательности длиной в 4 п. н., создавали бы более короткие фрагменты из молекулы ДНК с произвольной последовательностью, при этом распознаваемая последовательность такого размера встречалась бы в среднем один раз на каждые 4^4 (256) п. н. В природных молекулах ДНК специфические распознаваемые последовательности встречаются реже, потому что нуклеотидные последовательности в ДНК расположены не случайным образом, а четыре вида нуклеотидов содержатся не в равных количествах. В лабораторных экспериментах средний размер фрагментов, получаемых разрезанием большой молекулы ДНК эндонуклеазой рестрикции, может быть увеличен простой остановкой реакции до ее завершения, а результат называют неполной нарезкой. Размер фрагмента можно также увеличить при использовании особого класса эндонуклеаз, называемых хоуминг-эндонуклеазами (см. рис. 26-38). Они распознают и разрезают гораздо более длинные последовательности ДНК (от 14 до 20 п. н.).

После того как молекула ДНК была расщеплена на фрагменты, специфический фрагмент заданного размера можно получить электрофорезом в агарозном или полиакриламидном геле или с помощью ВЭЖХ (с. 135). Однако в случае типичного генома млекопитающих разрезание эндонуклеазой рестрикции обычно приводит к большому числу различных фрагментов ДНК, а это затрудняет выделение специфического фраг-

мента электрофорезом или ВЭЖХ. Клонированию специфического гена или сегмента ДНК, как правило, сопутствует создание библиотеки ДНК (описывается в разд. 9.2).

После выделения необходимого фрагмента ДНК можно использовать ДНК-лигазу для присоединения его к расщепленному таким же образом клонирующему вектору, т. е. к вектору, полученному с помощью той же эндонуклеазы рестрикции. Например, фрагмент, полученный с помощью *Eco*RI, как правило, не связывается с фрагментом, полученным с помощью *Vam*HI. Как это более подробно описано в гл. 25 (см. рис. 25-17), ДНК-лигаза катализирует образование новых фосфодиэфирных связей в реакции, использующей АТФ или сходный с ним кофактор. Спаривание оснований на комплементарных «липких» концах сильно облегчает лигирование (рис. 9-2, а). «Тупые» концы тоже можно лигировать, хотя и менее эффективно. Исследователи могут создавать новые последовательности ДНК, вставляя синтетические фрагменты ДНК (называемые **линкерами**) между лигируемыми концами. Встраиваемые фрагменты ДНК с множественными последовательностями, распознаваемыми эндонуклеазами рестрикции (обычно используемыми далее в качестве участков для встраивания дополнительных ДНК разрезанием и лигированием) называются **полилинкерами** (рис. 9-2, в).

Эффективность «липких» концов при избирательном соединении двух фрагментов ДНК стала очевидной в самых ранних экспериментах с рекомбинантными ДНК. Еще до того как эндонуклеазы рестрикции получили широкое применение, некоторые исследователи обнаружили, что создавать «липкие» концы можно путем комбинированного действия эндонуклеазы бактериофага λ и терминальной трансферазы (табл. 9-1). Соединяемые фрагменты содержали комплементарные гомополимерные «хвосты». Петер Лобан и Дэйл Кайзер использовали этот метод в 1971 г. в первых экспериментах по соединению фрагментов ДНК природного происхождения. Вскоре после этого подобные методы стали использоваться в лаборатории Пола Берга при соединении сегментов ДНК вируса обезьяны (SV40) с ДНК, полученной из бактериофага λ ; таким образом была создана первая молекула рекомбинантной ДНК с сегментами, полученными от разных видов.

Клонирующие векторы позволяют амплифицировать встроенные сегменты ДНК

Принципы, которые определяют доставку рекомбинантной ДНК в клонируемой форме в клетку-хозяина и ее дальнейшую амплификацию, можно проиллюстрировать на примере трех распространенных клонирующих векторов, используемых обычно в экспериментах с *E. coli*, — плазмид, бактериофагов и искусственных бактериальных хромосом — и вектора, используемого при клонировании больших сегментов ДНК в дрожжах.

Плазмиды. Плазмиды представляют собой кольцевые молекулы ДНК, которые реплицируются отдельно от хромосомы клетки-хозяина. В природе встречаются бактериальные плазмиды длиной от 5000 до 400 000 п. н. Они могут быть введены в клетки бактерий в ходе процесса, который называется **трансформацией**. Клетки (обычно это *E. coli*) и плазмидные ДНК инкубируют вместе при температуре 0 °С в растворе хлорида кальция, а затем подвергают термошоку при быстром нагревании до 37–40 °С. По не до конца понятной причине некоторые клетки при таком воздействии по-

глощают плазмидную ДНК. Есть виды бактерий, способные к поглощению ДНК и без воздействия хлорида кальция. В альтернативном методе инкубируемые с плазмидной ДНК клетки подвергают действию импульса высоковольтного напряжения. При таком подходе, называемом **электропорацией**, бактериальные мембраны кратковременно делаются проницаемыми для больших молекул.

При использовании любого метода трансформации лишь немногие клетки поглощают плазмидную ДНК, поэтому требуется способ отбора удачно трансформированных. Распространен подход, когда используют плазмиду, содержащую ген, необходимый клетке-хозяину для роста в специфических условиях, такой как, скажем, ген устойчивости к какому-то антибиотику. Только клетки, трансформированные рекомбинантной плазмидой, могут расти в присутствии этого антибиотика, делающего всякую клетку, содержащую плазмиду, «селектируемой» при таких условиях роста. Такой ген называется селективируемым маркером.

Путем изменения природных плазмид исследователи разработали много разных плазмидных векторов, пригодных для клонирования. Плазмида pBR322 *E. coli* хороший пример плазмид, удобных для клонирующего вектора (рис. 9-3).

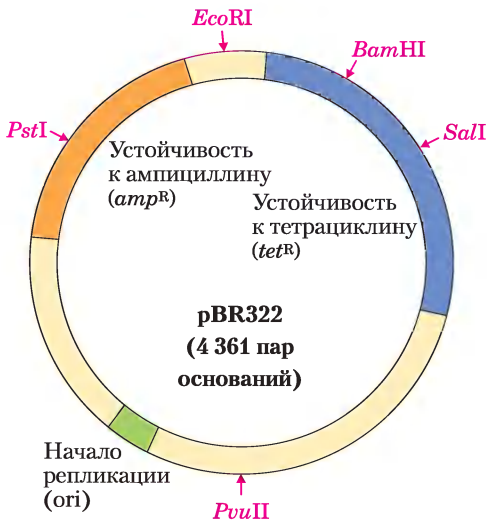


Рис. 9-3. Плазмида pBR322, созданная для *E. coli*. Обратите внимание на расположение некоторых важных участков рестрикции — для PstI, EcoRI, BamHI, SalI и PvuII; на гены устойчивости к ампициллину и тетрациклину; и на репликатор (ori). Созданная в 1977 г., она стала одной из первых плазмид, специально разработанных для клонирования в *E. coli*.

Важные преимущества плазмиды pBR322.

1. Участок начала репликации (ori) — последовательность, где инициируется репликация клеточными ферментами (гл. 25). Эта последовательность требуется для размножения плазмиды и поддержания ее в количестве 10–20 копий на одну клетку.
2. Два гена устойчивости к различным антибиотикам (tet^R , amp^R), что позволяет идентифицировать клетки, содержащие интактную плазмиду или ее рекомбинантный тип (рис. 9-4).
3. Некоторые уникальные распознаваемые различными эндонуклеазами рестрикции последовательности (PstI, EcoRI, BamHI, SalI, PvuII), где плазмида в дальнейшем может быть разрезана для вставки чужеродной ДНК.
4. Малый размер (4361 п. н.), который способствует ее проникновению в клетки и биохимическим манипуляциям с ДНК.

Трансформация типичных бактериальных клеток очищенной ДНК (сам по себе не очень результа-



Рис. 9-4. Использование рВВ322 для клонирования чужеродной ДНК в *E. coli* и идентификации клеток, содержащих ее. Плазмидное клонирование

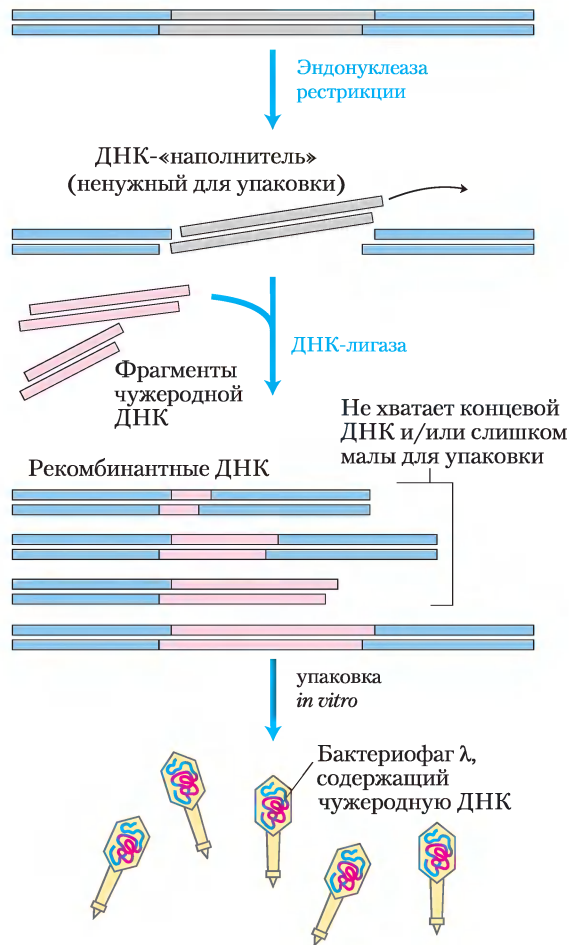


Рис. 9-5. Клонирование векторов на основе бактериофага λ . Для модификации генома бактериофага λ используется технология рекомбинантной ДНК — удаление ненужных для продуцирования фага генов и замена их ДНК-«наполнителем», чтобы сделать ДНК фага достаточно большой для помещения в частицы фага. Как показано здесь, в экспериментах по клонированию наполнитель заменяется чужеродной ДНК. Рекомбинанты упаковываются *in vitro* в жизнеспособные частицы фага только в том случае, если они содержат фрагмент чужеродной ДНК подходящего размера, а также принадлежащие бактериофагу λ концевые фрагменты ДНК.

тивный процесс) становится все менее успешной по мере увеличения размера плазмиды; поэтому трудно клонировать сегменты ДНК длиннее 15000 п. н., если в качестве вектора используются плазмиды.

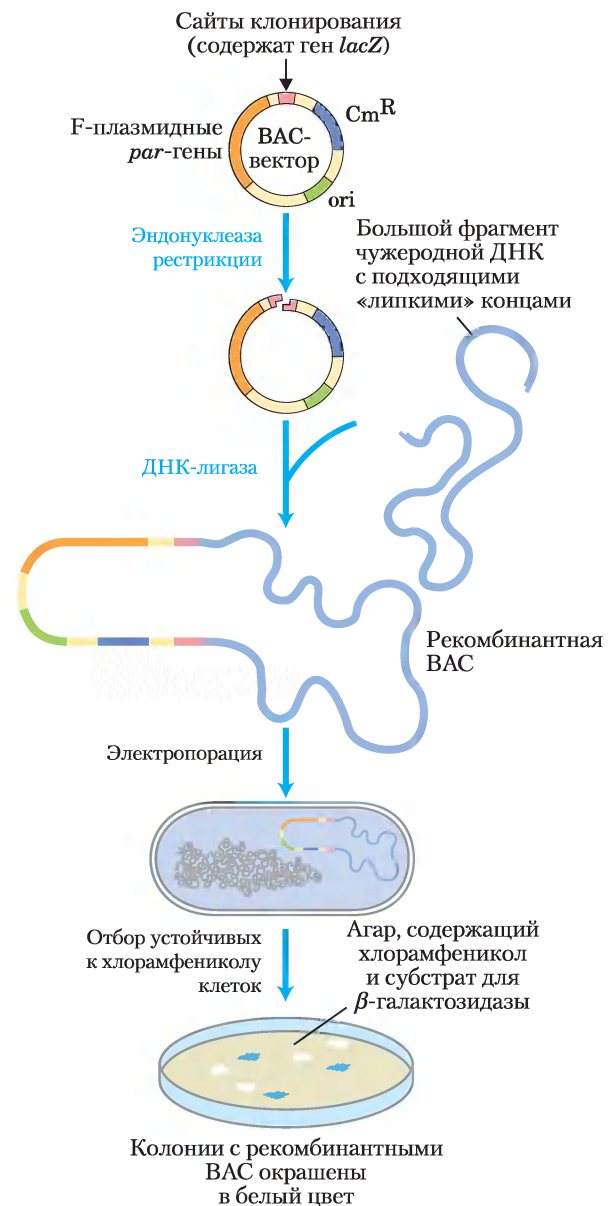
Бактериофаги. У бактериофага λ есть эффективный механизм переноса собственной ДНК (48502 п. н.) в бактерию, поэтому он может быть использован в качестве вектора при клонировании больших сегментов ДНК (рис. 9-5). Удобным его применение делают две ключевые особенности:

1. Почти треть генома λ незначительна и может быть заменена чужеродной ДНК.
2. ДНК упаковывается в частицы инфекционного фага только в том случае, если ее длина составляет от 40 000 до 53 000 п. н. и позволяет обеспечить упаковку только рекомбинантной ДНК.

Исследователи разработали векторы на основе бактериофага λ , которые могут быть легко

Рис. 9-6. Искусственные бактериальные хромосомы (ВАС) в качестве клонирующих векторов. Вектор является относительно простой плазмидой с локусом начала репликации (*ori*), управляющим репликацией. Гены *rag*, полученные из плазмид, называемых F-плазмидами, способствуют равномерному распределению плазмид по дочерним клеткам в процессе деления клетки. Это увеличивает вероятность того, что каждая дочерняя клетка будет нести одну копию плазмиды даже при наличии малого числа копий. Небольшое число копий полезно при клонировании больших сегментов ДНК, поскольку это ограничивает возможность протекания нежелательных реакций рекомбинации, что со временем непредсказуемым образом может изменить большие клонируемые ДНК. Вектор ВАС включает селективируемые маркеры. Ген *lacZ* (необходимый для синтеза фермента β -галактозидазы) располагается в клонирующем участке так, что он дезактивируется вставками клонируемых ДНК. Встраиванию электропорацией рекомбинантных ВАС в клетки способствует использование клеток с измененными (более пористыми) клеточными стенками. Скрининг рекомбинантных ДНК производится на основании устойчивости клеток к антибиотик хлорамфениколу (Sm^R). Чашки, на которых выращивают бактерии, также содержат субстрат для β -галактозидазы, что приводит к окрашиванию продуктов. Колонии с активной β -галактозидазой и, следовательно, не имеющие вставок ДНК в ВАС-векторе становятся синими, а колонии не обладающие активностью β -галактозидазы — и, таким образом, имеющие искомые вставки ДНК, — белыми.

расщеплены на три части таким образом, что две из них содержат необходимые гены бактериофага λ и вместе составляют всего около 30 000 п. н. в длину. Третья часть, ДНК-«наполнитель», выбрасывается, когда вектор нужно использовать для клонирования. Дополнительная ДНК вставляется между двумя необходимыми бактериофагу λ сегментами, образуя лигированные молекулы ДНК длиной, достаточной для получения жизнеспособных частиц фага. Механизм упаковки используется для селекции рекомбинантных вирусных частиц.



Векторы на основе бактериофага λ позволяют клонировать фрагменты ДНК длиной до 23000 п. н. Как только фрагменты бактериофага λ лигированы с фрагментами чужеродной ДНК подходящего размера, получившиеся рекомбинантные ДНК могут быть упакованы в фаговые частицы при добавлении к неочищенным (грубым) экстрактам бактериальных клеток, которые содержат все необходимые белки для сборки целого фага. Этот процесс называется **упаковкой *in vitro*** (рис. 9-5). Все жизнеспособные фаговые частицы будут содержать фрагмент чужеродной ДНК. Такой перенос рекомбинантной ДНК в клетки *E. coli* исключительно эффективен.

Искусственные бактериальные хромосомы (ВАС, от англ. *bacterial artificial chromosomes*).

Искусственные бактериальные хромосомы представляют собой плазмиды, разработанные для клонирования очень длинных (как правило, от 100 000 до 300 000 п. н.) сегментов ДНК (рис. 9-6). Они обычно содержат селективируемые маркеры, такие как ген устойчивости к антибиотику хлорамфениколу (Cm^R), а также очень стабильный локус начала репликации (*ori*), поддерживающий число плазмид (1–2 копии на клетку). В ВАС-векторы встраивают фрагменты ДНК из нескольких сотен тысяч пар оснований. Затем огромные кольцевые ДНК с помощью электропорации помещают в бактериальные клетки. В этих процедурах используют бактерии, содержащие мутации, которые изменяют структуру клеточной стенки, что позволяет поглощать большие молекулы ДНК.

Искусственные хромосомы дрожжей (YAC, от англ. *yeast artificial chromosomes*).

В генной инженерии клетки *E. coli* вовсе не единственные клетки-хозяева. Дрожжи — очень удобные эукариотические организмы для такой работы. Как и в случае с *E. coli*, генетика дрожжей хорошо изучена. Геном наиболее часто используемых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* содержит всего $14 \cdot 10^6$ п. н. (по эукариотическим стандартам, это небольшой геном, менее чем в четыре раза превышает размер хромосомы *E. coli*); вся его нуклеотидная последовательность известна. Дрожжи также очень легко содержать и выращивать в больших масштабах в лабораторных условиях. Теми же методами, что и в случае векторов для *E. coli*, были созданы плазмидные векторы для дрожжей. В на-

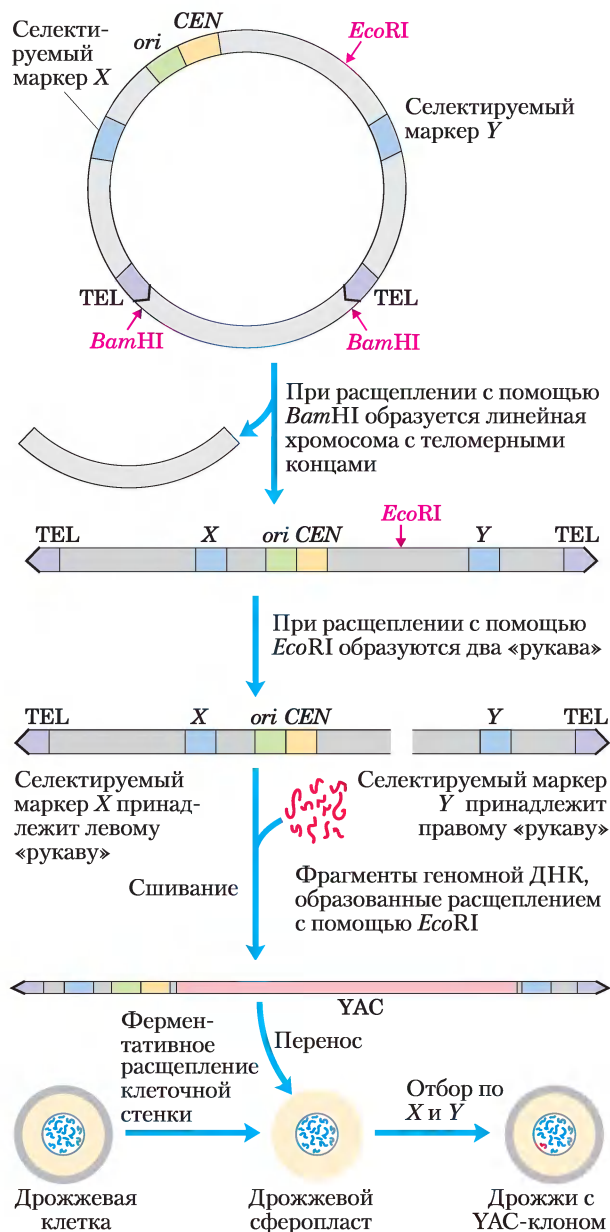


Рис. 9-7. Конструирование искусственной хромосомы дрожжей (YAC). YAC-вектор содержит локус начала репликации (*ori*), центромеру (*CEN*), две теломеры (*TEL*) и селективируемые маркеры (*X* и *Y*). Расщепление эндонуклеазами *Bam*HI и *Eco*RI создает два отдельных ДНК-«рукава»; каждый из них имеет один теломерный конец и один селективируемый маркер. Один большой сегмент ДНК (например, до $2 \cdot 10^6$ п. н. из генома человека) лигируется с двумя «рукавами», образуя искусственную хромосому дрожжей. YAC трансформирует дрожжевые клетки (сферопласты с заранее удаленными клеточными стенками), и они селективируются по *X* и *Y*; уцелевшие клетки реплицируют ДНК-вставку.

стоящее время в распоряжении имеются удобные методы переноса ДНК как из дрожжевых клеток, так и в них, что способствует углубленному изучению биохимии эукариотической клетки. Некоторые рекомбинантные плазмиды содержат несколько *ori* и других элементов, что дает возможность использовать их более чем для одного вида организмов (например, в клетках дрожжей или *E. coli*). Плазмиды, которые могут реплицироваться в клетках двух или более различных видов, называют **шаттл-векторами**.

Исследования больших геномов и связанная с этим потребность в клонирующих векторах высокой емкости привели к созданию **искусственных хромосом дрожжей (YAC; рис. 9-7)**. YAC-векторы включают в себя все необходимые элементы для жизнеобеспечения эукариотической хромосомы в ядре дрожжей: дрожжевой *ori*, два селективируемых маркера и специфические последовательности (полученные из теломер и центромер, участков ДНК, о которых пойдет речь в гл. 24), необходимые для стабильности и правильного расхождения хромосом при делении клетки. Прежде чем вектор будет использован в клонировании, он амплифицируется в виде кольцевой бактериальной плазмиды. Разрезание эндонуклеазой рестрикции (*Bam*HI на рис. 9-7) удаляет участок ДНК между двумя теломерными последовательностями (TEL), на концах линеаризованной ДНК остаются теломеры. Разрезание в другом участке (*Eco*RI на рис. 9-7) делит вектор на два сегмента ДНК, называемых векторными «рукавами», каждый из которых содержит свой селективируемый маркер.

Чтобы получился фрагмент подходящего размера, геномную ДНК подвергают неполному расщеплению эндонуклеазами рестрикции (*Eco*RI на рис. 9-7). Затем геномные фрагменты разделяют **пульсирующим гель-электрофорезом** (разновидность гель-электрофореза; см. рис. 3-18), который позволяет разделять очень большие сегменты ДНК. Фрагменты ДНК подходящего размера (до $2 \cdot 10^6$ п. н.) смешиваются с полученными «рукавами» векторов и лигируются. Затем полученная смесь используется для трансформации обработанных дрожжевых клеток очень большими молекулами ДНК. Выращивание на среде, для роста на которой необходимо наличие генов обоих селективируемых маркеров, обеспечивает отбор только тех дрожжевых клеток, у которых

есть искусственная хромосома с большой вставкой между двумя «рукавами» вектора (рис. 9-7). Стабильность YAC-клонов увеличивается с размером. Те YAC-клоны, у которых размер вставки превышает 100 000 п. н., примерно так же стабильны, как и обычные хромосомы клетки, в то время как другие — со вставкой менее 100 000 п. н. — гибнут во время митоза (так, например, дрожжевые клоны, имеющие всего два векторных конца, сшитых вместе, или клоны с короткими вставками, обычно не обнаруживаются). YAC, теряющие теломеры на обоих концах, быстро разрушаются.

Специфические последовательности ДНК определяют при гибридизации

Гибридизация ДНК, о которой в общих чертах говорилось в гл. 8 (см. рис. 8-29), является наиболее доступным специфичным к последовательности нуклеотидов методом детектирования отдельных генов или сегментов нуклеиновых кислот. Существует много разновидностей основного метода, где используются, главным образом, меченые (например, радиоактивные) фрагменты ДНК или РНК (зонды), комплементарные искомой ДНК. Согласно классическому подходу, для обнаружения определенной последовательности ДНК в клонотеке (совокупность клонов ДНК) на чашку с агаром, содержащую множество отдельных бактериальных колоний из клонотеки, с различной рекомбинантной ДНК в каждой, помещают нитроцеллюлозную бумагу. Несколько клеток из каждой колонии прилипают к бумаге, образуя реплику. Затем бумагу обрабатывают щелочью для разрушения клеток и денатурации ДНК; молекулы ДНК остаются связанными на бумаге вблизи колоний, откуда они были получены. Добавленный радиоактивный ДНК-зонд связывается только с комплементарной ему ДНК. После вымывания несвязавшихся ДНК-зондов гибридизованную таким образом ДНК можно обнаружить автордиографией (рис. 9-8).

Как правило, создание комплементарной нуклеотидной цепи, используемой в качестве зонда, является лимитирующим шагом при определении и клонировании гена. Природа зонда зависит от того, что известно об исследуемом гене. Иногда подходящим зондом является гомологичный ген, клонированный из других видов. Или, если уже был получен белковый продукт гена,

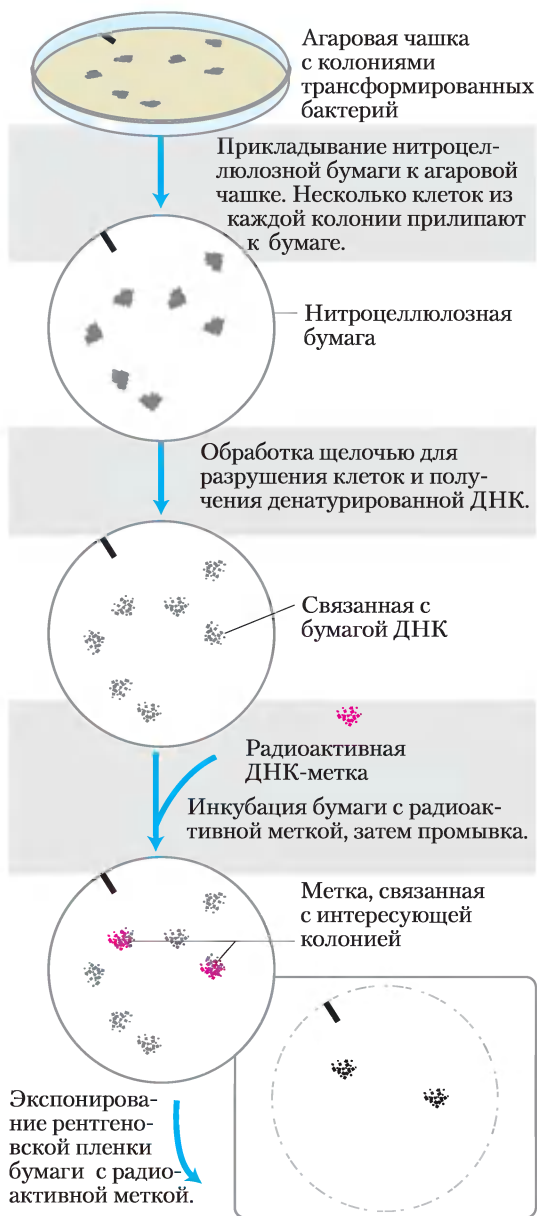


Рис. 9-8. Использование гибридизации для идентификации клона с определенным сегментом ДНК. Радиоактивный ДНК-зонд гибридизируется с комплементарной ему ДНК, а затем обнаруживается автордиографией. После идентификации меченых колоний соответствующие им колонии на исходной агаровой чашке можно использовать в дальнейших экспериментах в качестве источника клонируемой ДНК.

зонд можно спроектировать и синтезировать, исходя из аминокислотной последовательности (рис. 9-9). На сегодняшний день всю необходимую информацию о последовательности ДНК исследователи, как правило, получают из баз

данных нуклеотидных последовательностей, в которых подробно описана структура миллионов генов очень многих организмов.

Экспрессия клонированных генов дает значительное количество белка

Зачастую основной интерес представляет продукт клонированного гена, а не сам ген, особенно когда белок обладает коммерческой, терапевтической или исследовательской ценностью. Теперь, когда основы метаболизма и регуляции ДНК, РНК и белков в *E. coli* становятся все более понятными, исследователи уже могут манипулировать клетками для экспрессии клонированных генов с целью изучения их белковых продуктов.

Большинство генов эукариот лишены элементов последовательности ДНК, необходимых для их экспрессии в клетках *E. coli* (таких как промоторы — последовательности, указывающие ДНК-полимеразе места связывания). Поэтому в подходящие для эукариотических генов места в ДНК вектора должны быть помещены бактериальные регуляторные последовательности транскрипции и трансляции. Промоторы, регуляторные последовательности и другие аспекты регуляции генной экспрессии обсуждаются в гл. 28. В некоторых случаях клонированные гены экспрессируются так эффективно, что их белковый продукт составляет более 10% всего клеточного белка; тогда говорят, что они гиперэкспрессированы. При таких концентрациях некоторые чужеродные белки могут убить клетку *E. coli*, так что экспрессию гена надо ограничить несколькими часами до сбора клеток.

Клонирующие векторы с сигналами транскрипции и трансляции, необходимыми для регулируемой экспрессии клонированного гена, часто называют **экспрессирующими векторами**. Скорость экспрессии клонированного гена контролируется при замене собственных промоторных и регуляторных последовательностей гена на более эффективные и подходящие варианты, предоставляемые вектором. Как правило, хорошо охарактеризованный промотор и его регуляторные элементы располагаются вблизи нескольких специфических участков рестрикции, используемых при клонировании, так, чтобы гены, вставляемые по этим участкам, экспрессировались регулируемым про-

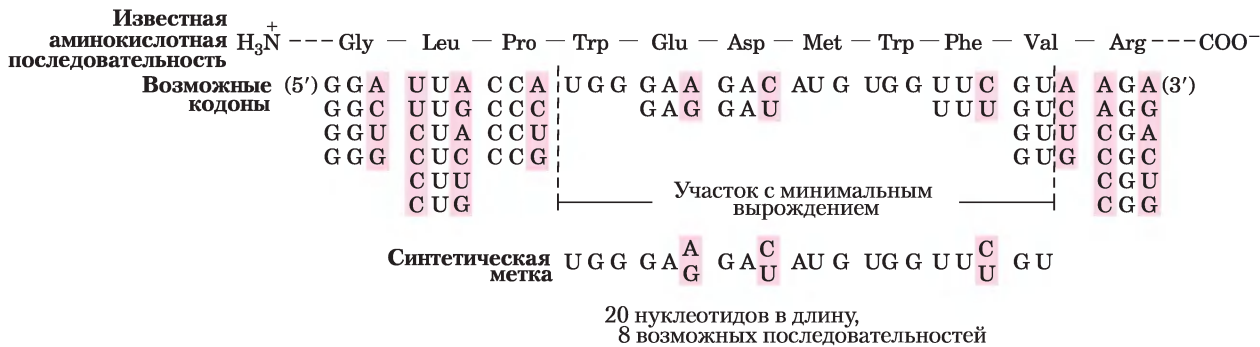


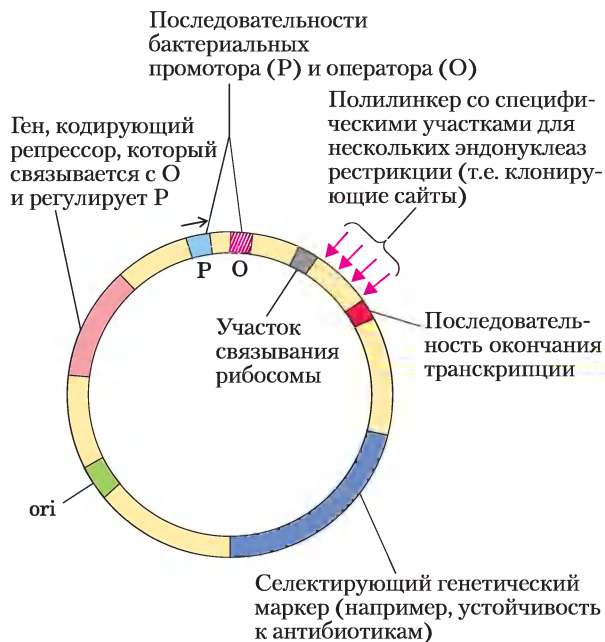
Рис. 9-9. Метка для определения гена, кодирующего белок с известной нуклеотидной последовательностью. Из-за того что более одной последовательности ДНК может кодировать любую данную аминокислотную последовательность, говорят, что генетический код «вырожден» (об этом см. в гл. 27; каждая аминокислота кодируется набором из трех нуклеотидов — **кодоном**. Большинству аминокислот соответствуют два или более кодонов; см. рис. 27-7). Таким образом, искомая последовательность ДНК для известной аминокислотной последовательности не может быть заранее определена. Зонд проектируется так, чтобы быть комплементарным участку гена с минимальным «вырождением», т. е. участку с минимальным числом возможных кодонов для аминокислот; в приведенном здесь примере не более двух кодонов. Олигонуклеотиды синтезируются с селективно рандомизированными последовательностями, так что они содержат один из двух возможных нуклеотидов в каждом месте потенциального вырождения (окрашены в розовый цвет). Приведенный здесь олигонуклеотид представляет собой совокупность из восьми различных последовательностей, при этом одна из них будет полностью комплементарна гену, а все восемь вместе соответствуют, по крайней мере, 17 из 20 позициям.

моторным элементом (рис. 9-10). Некоторые из таких векторов включают в себя и другие характерные участки, например место связывания бактериальной рибосомы для улучшения трансляции мРНК, полученной с гена, или последовательность окончания транскрипции.

Гены можно также клонировать и экспрессировать в эукариотических клетках; обычно в качестве хозяев используют различные виды дрожжей. Эукариотический хозяин иногда мо-

Рис. 9-10. Последовательности ДНК в типичном экспрессирующем векторе *E. coli*. Экспрессируемый ген вставляется на одном из участков рестрикции полилинкера вблизи промотора (P) так, чтобы ближайшим к промотору был конец, кодирующий N-концевую аминокислотную последовательность. Промотор способствует эффективной транскрипции вставленного гена, а последовательность терминатора транскрипции иногда увеличивает количество и стабильность получаемой мРНК. Оператор (O) осуществляет регуляцию с помощью репрессора, который связывается с ним (гл. 28). Участок связывания рибосомы обеспечивает сигналы, необходимые для эффективной трансляции мРНК, полученной от гена. Селектирующий маркер позволяет отобрать клетки, содержащие рекомбинантную ДНК.

жет осуществлять посттрансляционные модификации (изменения в белковой структуре, происходящие после синтеза на рибосомах), которые могут потребоваться для функционирования клонированного белка эукариот.



Изменения в клонированных генах приводят к получению модифицированных белков

Технологии клонирования можно использовать не только для получения больших количеств белка, но и для синтеза белковых продуктов, слегка отличающихся от их природных форм. Специфические аминокислоты можно заменять по отдельности, используя **сайт-специфичный мутагенез**. Этот мощный метод изучения строения и функций белка основан на изменении аминокислотной последовательности путем модификации последовательности ДНК в клонируемом гене. Если подходящие участки рестрикции расположены по обе стороны от модифицируемой нуклеотидной последовательности, тогда можно просто вырезать сегмент ДНК и заменить его синтетическим аналогом, идентичным оригиналу за исключением желаемого изменения (рис. 9-11, а). В том случае, если удобно расположенных участков рестрикции нет, можно произвести изменения в специфической ДНК-последовательности при использовании подхода, называемого **олигонуклеотид-направленным мутагенезом** (рис. 9-11, б) Короткая синтетическая цепочка ДНК со специфическим изменением в паре оснований гибридизуется с одноцепочечной копией клонируемого гена в подходящем векторе. Несоответствие одной пары оснований на 15–20 пар не препятствует гибридизации, если это происходит при подходящей температуре. Эта цепочка служит праймером для синтеза цепи, комплементарной плазмидному вектору. Затем такая двойная рекомбинантная плазида с небольшим несоответствием (мисматчем, от англ. *mismatch*) используется для трансформации бактерий, в которых мисматчи исправляются клеточными ферментами репарации ДНК (гл. 25). Около половины актов репарации будут удалять и заменять модифицированное основание, возвращая ген к его исходной последовательности; другая половина удалит и заменит *нетронутое* основание, сохраняя желаемую мутацию. Трансформированные клетки тщательно проверяют (часто секвенированием их плазмидной ДНК), пока не будет найдена бактериальная колония, содержащая плазмиду с измененной последовательностью.

Изменения можно также осуществить более чем в одной паре оснований. Большие участки гена могут быть удалены вырезанием сегмента

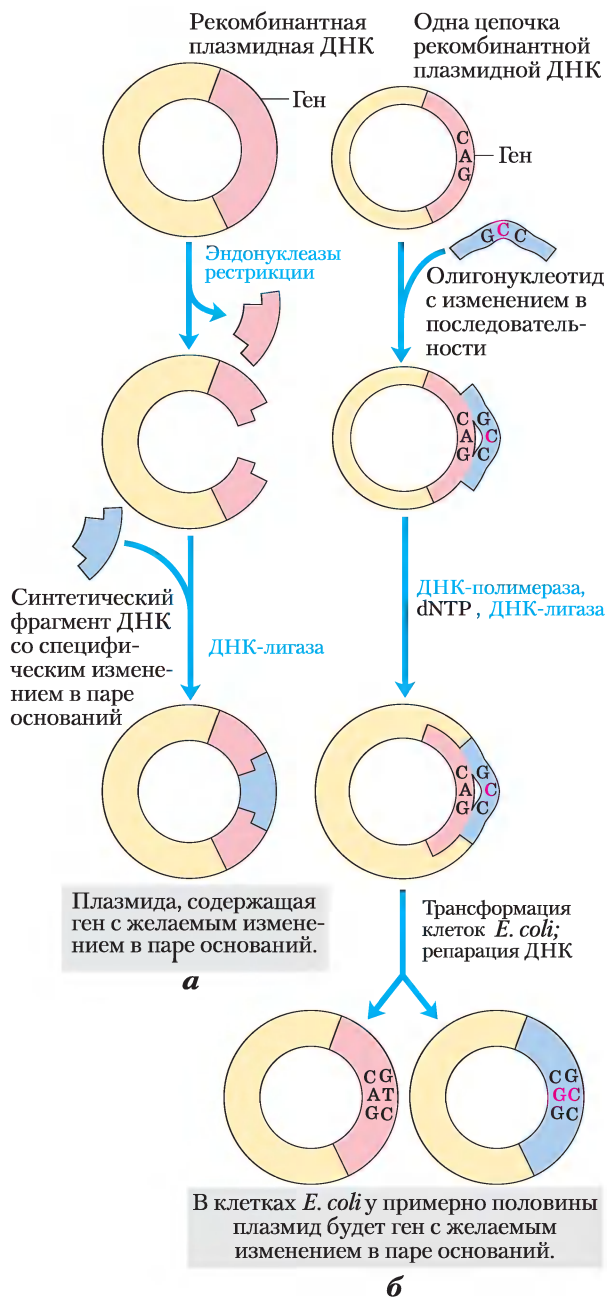


Рис. 9-11. Два подхода к сайт-специфичному мутагенезу. а) Синтетический сегмент ДНК заменяет фрагмент ДНК, который был удален вырезанием эндонуклеазой рестрикции. б) Синтетический олигонуклеотид с желаемым изменением последовательности в одном месте гибридизуется с одноцепочечной копией модифицируемого гена и действует как затравка для синтеза двухцепочечной ДНК (с одним мисматчем), которая затем используется для трансформации клеток. Репарирующие системы клеточной ДНК исправляют около 50% несоответствий, отражая желаемое изменение в нуклеотидной последовательности.

эндонуклеазами рестрикции и сшиванием оставшихся частей с образованием меньшего по размерам гена. Части двух различных генов можно сшить в новые комбинации. Продукт такого смешанного гена называют **слитым белком** (фьюжн-белком).

Современные исследователи располагают оригинальными методами для осуществления практически любого генетического изменения *in vitro*. Встраивание измененной ДНК в клетку позволяет изучать результаты такого изменения. Сайт-специфичный мутагенез чрезвычайно продвинул исследование белков, поскольку дал возможность ученым производить специфические изменения в первичной структуре белка и изучать эффекты таких изменений на конформацию, трехмерную структуру и активность белка.

В аффинной хроматографии связывание обеспечивают концевые последовательности

Аффинная хроматография — один из самых эффективных методов очистки белка (см. рис. 3-17, в). Однако, к сожалению, для многих белков пока не найдено лигандов, которые можно иммобилизовать на твердом носителе. Теперь же после создания слитых белков метод аффинной хроматографии применим для очистки практически любого белка.

Для этой цели сначала надо создать конструкцию ДНК, где ген искомого белка соединен с геном, который кодирует пептид или белок, связывающийся с высоким сродством и специфично

с известным лигандом (подходящим для искомого белка). К N- или C-концу ДНК присоединяют этот пептид или белок, последовательность которого становится теперь концевой и называется **тэгом** (от англ. *tag* — метка, ярлык). В табл. 9-3 перечислены некоторые белки и пептиды, часто используемые в качестве концевых последовательностей (тэгов), а также их лиганды.

Ход эксперимента проиллюстрирован на примере присоединения к выделяемому белку последовательности глутатион-S-трансферазы (ГСТ). Фермент ГСТ — небольшая молекула ($M_r = 26\ 000$), который с высоким сродством и специфичностью связывается с глутатионом (рис. 9-12). Если создать конструкцию, в которой ген ГСТ слит с геном искомого белка, такой химерный белок приобретет способность связывать глутатион. Химерный белок экспрессируют в бактериальных или других клетках, а затем готовят неочищенный (грубый) клеточный экстракт для хроматографического разделения. Хроматографическую колонку заполняют пористым носителем, например микрошариками из перекрестно-сшитой агарозы, на которой иммобилизован лиганд (в данном случае глутатион). Все другие белки из экстракта проходят через колонку, не связываясь с носителем. ГСТ прочно связывается с глутатионом, но связь эта нековалентная, поэтому белок легко можно смыть с колонки с помощью раствора, содержащего либо высокую концентрацию соли, либо свободный глутатион, который конкурирует с иммобилизованным лигандом за связывание с ГСТ. Таким путем часто удается получить очищенный белок с высоким выходом. Иногда концевую последовательность частично или полностью отделяют от очищенного белка с помощью протеазы, которая расщепляет последовательность в области связывания с глутатионом.

Примером короткой концевой последовательности, которая находит множество применений, может служить простая цепь из шести или большего числа остатков гистидина (**6×His**). Эта последовательность с высоким сродством и специфичностью связывается с ионами никеля. Колонка с иммобилизованными ионами никеля может применяться для эффективного отделения белка с гистидиновой последовательностью на конце от остальных белков в смеси. Более крупные концевые последовательности, такие как мальтозосвязывающий белок,

Таблица 9-3 Часто используемые белковые тэги

Тэг / пептид	Молекулярная масса, кДа	Иммобилизованный лиганд
Белок А	59	Fc-участок IgG
(His) ₆	0,8	Ni ²⁺
Глутатион-S-трансфераза	26	Глутатион
Мальтозосвязывающий белок	41	Мальтоза
β-Галактозидаза	116	n-Аминофенил-β-D-тиога-лактозидаза (TPEG)
Хитинсвязывающий домен	5,7	Хитин

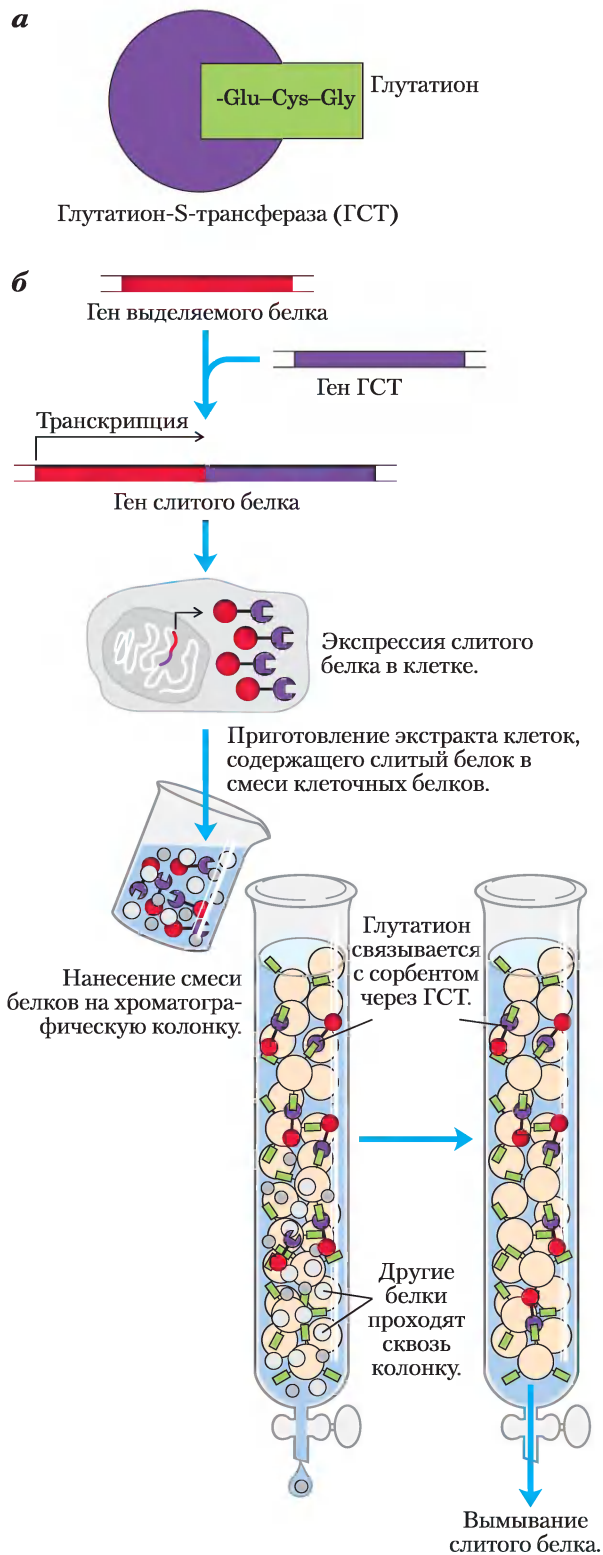


Рис. 9-12. Использование химерных конструкций для очистки целевого белка. В качестве примера рассматривается очистка белка, слитого с глутатион-S-трансферазой (ГСТ). *а*) ГСТ представляет собой небольшой фермент (изображенный здесь в виде кружка фиолетового цвета), который связывает глутатион. (Глутатион — трипептид γ -глутамилцистеинилглицин, содержащий необычную пептидную связь между аминокислотой цистеина и углеродом карбоксильной группы боковой цепи глутамата.) *б*) ГСТ присоединяют к С-концу выделяемого белка генно-инженерным методом. Химерный белок экспрессируется в хозяйской клетке и присутствует в грубом экстракте после лизиса клеток. Экстракт наносят на хроматографическую колонку с носителем, на котором иммобилизован глутатион. Химерный белок связывается с глутатионом и задерживается на колонке, тогда как остальные белки быстро вымываются. Химерный белок затем смывают с колонки с помощью раствора, содержащего высокую концентрацию соли или свободный глутатион.

могут повысить растворимость и устойчивость выделяемых белков, что позволяет очистить белки, которые не удастся получить другими методами.

Методы с использованием концевых последовательностей удобны и эффективны, что объясняет их широкое применение. Однако в этой работе следует проявлять определенную осторожность. Дело в том, что концевые последовательности не являются инертными. Даже очень короткие тэги могут изменять свойства белков, к которым они прикреплены, и влиять на результаты эксперимента. Активность белка может измениться даже после удаления концевой последовательности с помощью протеазы, например если один или несколько аминокислотных остатков остаются связанными с выделяемым белком. Экспериментальные результаты, полученные таким методом, всегда следует оценивать с помощью хорошо продуманного контроля, чтобы учесть влияние посторонней последовательности на функции изучаемого белка.

Краткое содержание раздела 9.1 КЛОНИРОВАНИЕ ДНК: ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

■ В клонировании ДНК и генной инженерии используют разрезание ДНК и объединение сегментов ДНК в новую комбинацию — рекомбинантную ДНК.

- Клонирование подразумевает разрезание ДНК ферментами на фрагменты; выбор и возможность модификации интересующего фрагмента; вставку фрагмента ДНК в подходящий клонирующий вектор; перенос вектора со вставленной в него ДНК в клетку-хозяина для репликации; идентификацию и отбор клеток, содержащих фрагмент ДНК.
- Ключевые ферменты в клонировании гена — эндонуклеазы рестрикции (особенно типа II) и ДНК-лигаза.
- Клонированными векторами могут служить плазмиды, бактериофаги, для самых длинных вставок ДНК — искусственные бактериальные хромосомы (BAC) и искусственные хромосомы дрожжей (YAC).
- Клетки, содержащие определенные последовательности ДНК, можно идентифицировать методами ДНК-гибридизации.
- Методами генной инженерии можно манипулировать клетками, вызывая экспрессию и/или изменения клонируемых генов.
- Белки или пептиды могут быть генно-инженерным методом связаны с целевым белком, в результате чего образуется химерный белок. Дополнительный пептидный участок может быть использован для обнаружения целевого белка или для его очистки методом аффинной хроматографии.

9.2. От генов к геномам

Современная наука **геномика** позволяет изучать ДНК в масштабе клетки, от отдельных генов до полного генетического комплекта организма — его генома. Геномные базы данных быстро растут по мере того, как завершается очередной этап секвенирования. Биология в XXI в. будет продвигаться с помощью информационных ресурсов, что всего несколько лет назад было даже трудно себе представить. Теперь обратимся к рассмотрению некоторых технологий, лежащих в основе такого прогресса.

Библиотеки ДНК представляют собой специализированные каталоги генетической информации

В библиотеке ДНК собраны ДНК-клоны, которые могут служить источником ДНК для секвенирования и идентификации гена или изучения его функций. Библиотеки могут быть нескольких типов в зависимости от источника ДНК. Одной из самых больших библиотек ДНК является **геномная библиотека**; данные для нее получают при разрезании целого генома организма на тысячи фрагментов; *все* эти фрагменты клонируют путем их вставки в клонирующий вектор.

Первый шаг в получении геномной библиотеки — частичное расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции, так чтобы любая ее последовательность встречалась во фрагментах определенного диапазона длин, сопоставимого с клонирующим вектором и гарантирующего присутствие практически всех последовательностей в клонах библиотеки. Слишком большие или слишком малые для клонирования фрагменты удаляют центрифугированием или электрофорезом. Клонированный вектор, такой как плаزمид BAC или YAC, разрезается такой же эндонуклеазой рестрикции и лигируется геномными фрагментами ДНК. Совокупность связанных таким образом ДНК затем используется для трансформации бактериальных или дрожжевых клеток, образуя библиотеку типов клеток таким образом, что каждый тип несет в себе разную рекомбинантную молекулу ДНК. В идеальном случае вся ДНК в изучаемом геноме представлена в библиотеке. Каждая трансформированная бактериальная или дрожжевая клетка образует колонию, или «клон», идентичных клеток, причем каждая клетка включает в себя одну и ту же рекомбинантную плазмиду, одну из многих, представленных во всей библиотеке.

Используя методы гибридизации, исследователи могут упорядочить отдельные клоны в библиотеке, идентифицируя клоны с перекрывающимися последовательностями. Набор перекрывающихся клонов представляет собой каталог элементов протяженного участка генома, который часто называют **контигом (рис. 9-13)**. Установленные ранее нуклеотидные последовательности целых генов можно найти в библиотеке методами гибридизации, определяя, какие

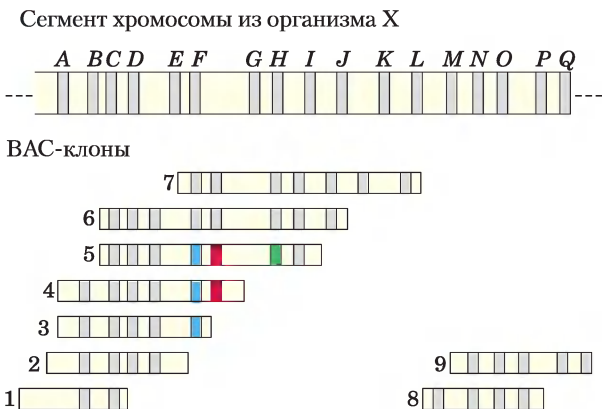


Рис. 9-13. Упорядочение клонов в библиотеке ДНК. Представлен сегмент хромосомы гипотетического организма X с маркерами от A до Q, изображающими ДНК-маркирующие сайты (STS — участки ДНК с известными нуклеотидными последовательностями, включая известные гены). Под хромосомой изображен набор упорядоченных ВАС-клонов с номерами от 1 до 9. Упорядочение клонов на генетической карте является многостадийным процессом. Присутствие или отсутствие STS в отдельном клоне можно определить гибридизацией — например, зондированием каждого клона ДНК, полученной из STS с помощью ПЦР. Как только все STS в каждом ВАС-клоне идентифицированы, клоны (и сами STS, если их местоположение еще неизвестно) можно расположить на карте в определенном порядке. Например, сравним клоны 3, 4 и 5. Маркер E (синий) обнаружен во всех трех клонах; F (красный) в клонах 4 и 5, но не в 3; и G (зеленый) только в клоне 5. Это означает порядок следования сайтов: E, F, G. Клоны частично перекрываются и их очередность должна быть 3, 4, 5. Конечный упорядоченный набор клонов называется контигом.

именно клоны в библиотеке содержат искомую последовательность. Если же последовательность уже была картирована на хромосоме, то можно определить местонахождение (во всем геноме) клонированной ДНК и любого контига, частью которого она является. Хорошо организованные библиотеки могут содержать тысячи длинных контигов, относящихся к определенным хромосомам и упорядоченных в соответствии с ними, образуя подробную геномную карту. Известные последовательности в библиотеке (каждый из которых называется **ДНК-маркирующим сайтом**, или **STS**; от англ. *sequence-tagged site*) могут стать ориентирами для проектов по расшифровке геномов.

По мере того как все больше и больше нуклеотидных последовательностей генома становятся доступными, использование геномных библиотек постепенно убывает, и исследователи создают более специализированные библиотеки, предназначенные для изучения функций генов. В качестве примера можно привести библиотеку, которая включает только те гены, которые *экспрессируются* — т. е. транскрибируются в РНК — в данном организме или в определенных клетках или тканях. В таком банке нет некодирующих последовательностей, которые составляют значительную

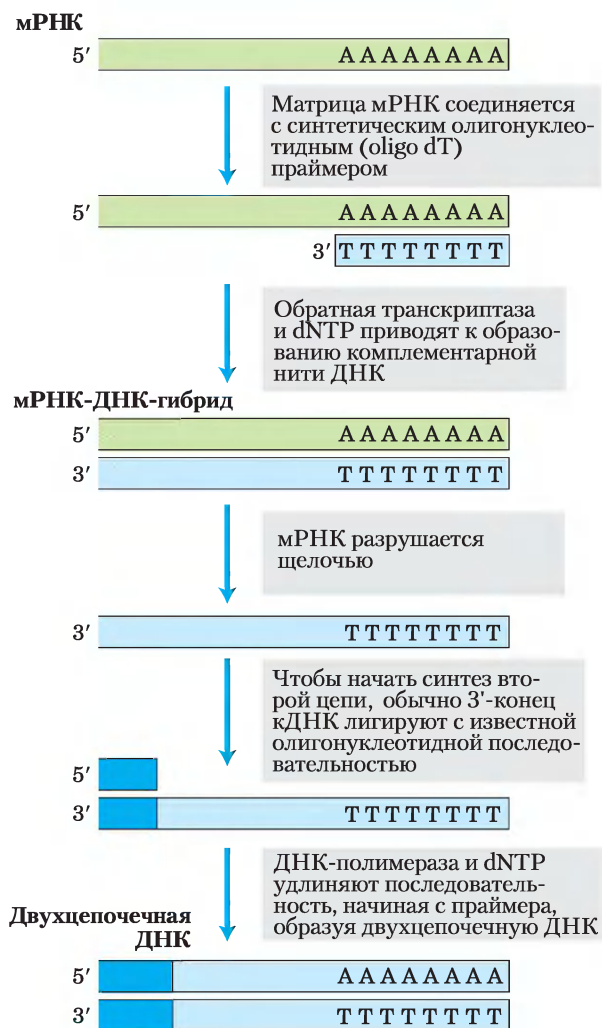


Рис. 9-14. Создание библиотеки кДНК из мРНК. Клеточная мРНК состоит из транскриптов тысяч генов, и образующиеся кДНК гетерогенны. Получаемая таким методом двойная цепь ДНК помещается в подходящий клонирующий вектор. Обратная транскриптаза может синтезировать ДНК на РНК- или ДНК-матрице (см. рис. 26-33).

часть многих геномов эукариот. В первую очередь из организма или из его специфических клеток выделяют мРНК, а затем из РНК получают **комплементарные ДНК (кДНК)** в многостадийной реакции, которую катализирует фермент обратная транскриптаза (рис. 9-14). Получившиеся в результате фрагменты двухцепочечной ДНК затем помещают в подходящий вектор и клонируют, образуется популяция клонов — **библиотека кДНК**. Поиск определенного гена становится легче при обращении к библиотеке кДНК, образованной из мРНК клетки, когда известно, что данный ген экспрессируется. Например, если бы мы решили клонировать гены глобина, то вначале пришлось бы создать библиотеку кДНК из клеток-предшественников эритроцитов, в которых около половины мРНК кодируют глобины. Чтобы облегчить картирование больших геномов, кДНК в библиотеке можно частично секвенировать в произвольном порядке для образования полезного типа STS, названного **меткой экспрессируемой последовательности (EST, от англ. *expressed sequence tag*)**. В диапазоне длин от нескольких десятков до сотен пар оснований можно расположить EST на карте большого генома и обеспечить таким образом, маркеры экспрессируемых генов. На подробные геномные карты нанесены сотни тысяч EST; они использовались в качестве ориентиров при расшифровке генома человека.

Библиотеку кДНК можно сделать даже более специализированной, клонируя кДНК или фрагмент кДНК в вектор, в котором кДНК-последовательность соединена с последовательностью маркера или сигнального гена; соединенные гены образуют «сигнальную конструкцию». Двумя подходящими маркерами являются гены зеленого флуоресцентного белка и эпитопные метки. Исходный ген, соединенный с геном зеленого флуоресцентного белка (GFP, от англ. *green fluorescent protein*), приводит к образованию слитого белка с интенсивной флуоресценцией — он буквально светится (рис. 9-15, а). Зеленый флуоресцентный белок (GFP) из медузы *Aequorea victoria* имеет структуру β-бочонка, внутри которого находится флуорофор (см. доп. 12-3, с. 612). Флуорофор образуется в результате перегруппировки и окисления нескольких аминокислотных остатков в автокаталитической реакции, для которой нужен только молекулярный кислород (см. доп. 12-3, рис. 3). Поэтому этот белок легко

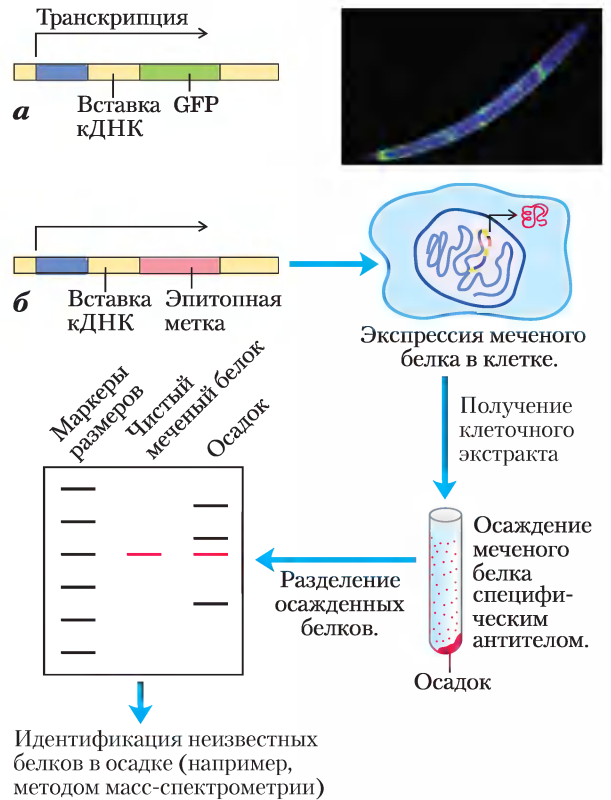


Рис. 9-15. Специализированные библиотеки ДНК.

а) Клонирование кДНК вблизи гена зеленого флуоресцентного белка (GFP) создает сигнальную конструкцию. В интересующем (вставка ДНК) и сигнальном генах происходит транскрипция РНК, а затем из мРНК-транскрипта получается слитый белок, GFP-часть которого видна в флуоресцентный микроскоп. На фотографии показан круглый червь, содержащий GFP-слитый белок, который проявляется на его теле только в четырех местах. **б)** Если кДНК клонируется вблизи гена эпитопной метки, получающийся слитый белок можно осадить антителами к эпитопу. Любые другие белки, которые взаимодействуют с меченым, также осаждаются, помогая объяснять белок-белковые взаимодействия.

клонировать в активной форме практически в любой клетке. Всего нескольких молекул белка достаточно, чтобы увидеть их под микроскопом; это позволяет следить за его перемещениями в клетке. Методом белковой инженерии удалось получить мутантные формы белка, способные светиться другими цветами и обладающие некоторыми другими свойствами (яркостью, стабильностью). Кроме того, несколько родственных белков были недавно выделены из организмов других видов.

Эпитопная метка представляет собой короткую белковую последовательность, которая крепко связывается хорошо изученным моноклональным антителом (гл. 5). Меченый белок можно специфически осадить из общего белкового экстракта взаимодействием с антителом (рис. 9-15, б). Если еще какие-нибудь белки прикрепятся к меченому, то они также будут осаждены, предоставляя информацию о белок-белковых взаимодействиях в клетке. Разнообразие и практическая ценность специализированных библиотек ДНК растут с каждым годом.

Полимеразная цепная реакция амплифицирует специфические последовательности ДНК

Проект «Геном человека» вместе с другими подобными попытками секвенирования геномов организмов любого вида обеспечили беспрецедентный доступ к генетической информации. Это в свою очередь упрощает процесс клонирования отдельных генов для более детального биохимического анализа. Если известна нуклеотидная последовательность, по крайней мере, фланкирующих частей клонируемого фрагмента ДНК, то можно значительно увеличить число копий этого участка, применив **полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** — метод, созданный Кэри Маллис в 1983 г. Амплифицированную ДНК можно сразу клонировать или использовать во многих аналитических процедурах.

Метод ПЦР исключительно прост. Необходимо два синтетических олигонуклеотида, комплементарные последовательностям на противоположной цепи ДНК прямо перед концами амплифицируемого фрагмента. Олигонуклеотиды служат праймерами для репликации ДНК-полимеразой. 3'-Концы гибридных зондов направлены друг к другу и размещены для заправки синтеза ДНК по всему участку (рис. 9-16). (ДНК-полимеразы синтезируют нити ДНК из дезоксирибонуклеотидов, используя ДНК-матрицу; подробно об этом см. гл. 25.) Выделенную ДНК, содержащую амплифицируемый фрагмент, нагревают короткое время для денатурации, а затем охлаждают в присутствии большого избытка синтетических олигонуклеотидных праймеров. Затем добавляют четыре типа дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, и фрагмент ДНК с праймером избирательно реплицируется. Цикл нагревания, охлаждения

и репликации повторяется 25 или 30 раз в течение нескольких часов в ходе автоматизированного процесса, фрагмент ДНК, ограниченный праймерами, амплифицируется до тех пор, пока его можно будет без труда анализировать или клонировать. В методе ПЦР используется термостабильная ДНК-полимераза, например *Taq*-полимераза (полученная из бактерии, живущей при 90 °С), которая остается активной после каждого цикла нагревания и не нуждается в замене. Тщательная разработка праймеров, используемых при ПЦР, например включение в них участков разрезания эндонуклеазой рестрикции, может способствовать дальнейшему клонированию амплифицированной ДНК (рис. 9-16, б).

Технология ПЦР очень чувствительна: этим методом можно обнаружить и амплифицировать вплоть до одной молекулы ДНК практически в любом образце. Хотя ДНК и деградирует со временем (с. 415), ПЦР позволяет удачно клонировать ДНК из образцов возрастом более 40 000 лет. Исследователи применили эту технологию для клонирования фрагментов ДНК из мумифицированных останков людей и вымерших животных, например мамонта; таким образом появились новые научные направления — молекулярная археология и молекулярная палеонтология. ДНК из обнаруженных захоронений амплифицировали с помощью ПЦР, а затем использовали, чтобы проследить пути миграции древнего человека. Эпидемиологи могут использовать образцы ДНК из человеческих останков, полученные методом ПЦР, для наблюдения за эволюцией патогенных вирусов человека. Помимо клонирования ДНК метод ПЦР также эффективен в судебной медицине (доп. 9-1). Кроме того, ПЦР можно использовать для выявления вирусных инфекций, прежде чем они вызовут симптомы, а также для перенатальной диагностики генетических заболеваний.

Метод ПЦР также важен для выполнения задач секвенирования целого генома. Например, картирование экспрессируемых участков на определенной хромосоме часто включает амплификацию EST методом ПЦР, после чего следует гибридизация амплифицируемой ДНК с клонми упорядоченной библиотеки. Было предложено также много других применений ПЦР для проекта «Геном человека», о котором сейчас и пойдет речь.

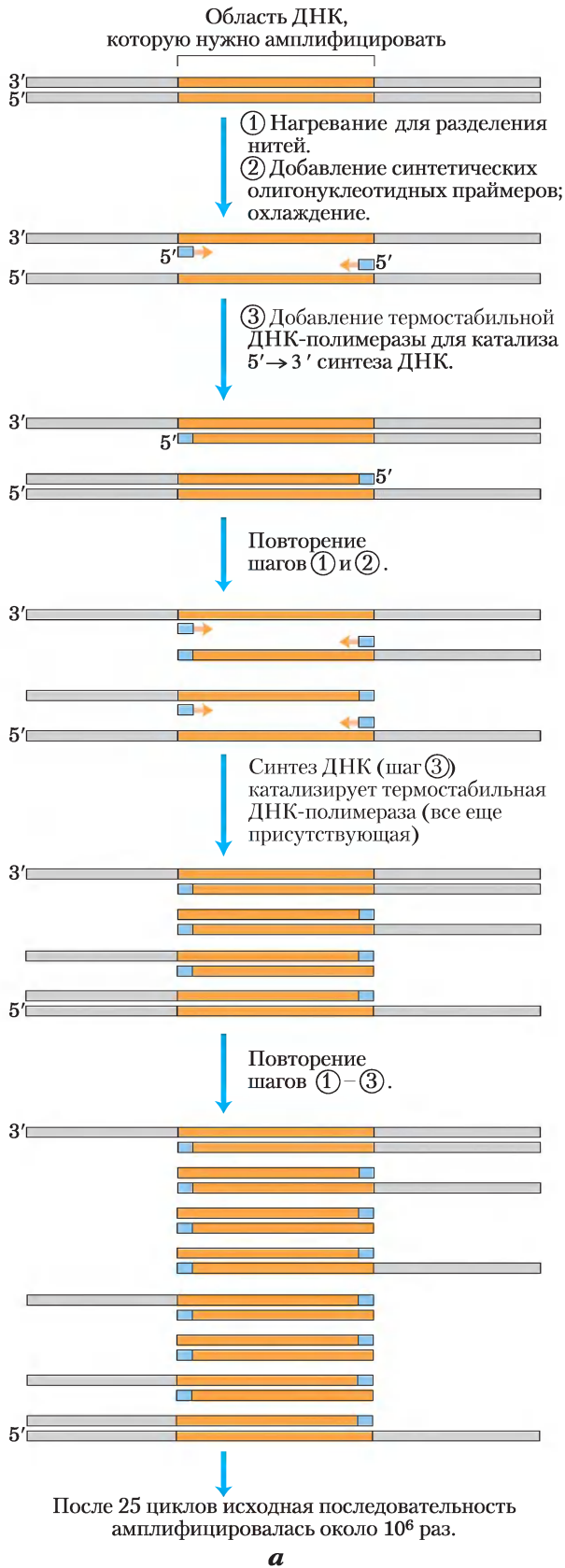
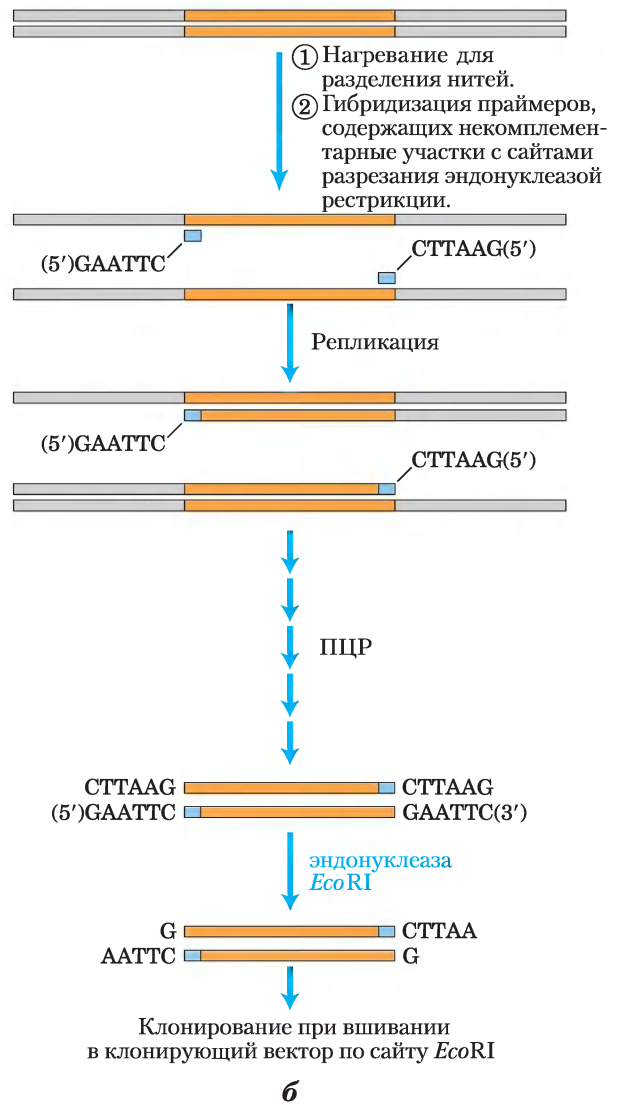


Рис. 9-16. Амплификация сегмента ДНК полимеразной цепной реакцией. а) Процедура ПЦР состоит из трех шагов. Нити ДНК ① разделяются при нагревании, затем ② происходит гибридизация в избытке коротких синтетических ДНК-праймеров (синие), которые ограничивают амплифицируемую область; ③ полимеризация — синтез молекул ДНК. Эти три шага повторяют от 25 до 30 раз. Термостабильная ДНК-полимераза *TaqI* (из *Thermus aquaticus*, бактериального вида, обитающего в термальных источниках) не денатурирует на этапах нагревания. б) ДНК, амплифицируемую с помощью ПЦР, можно клонировать. Праймеры могут содержать в себе некомплементарные концы, соответствующие сайтам разрезания эндонуклеазой рестрикции. Хотя эти части праймеров и не связываются с ДНК, в ходе ПЦР они включаются в амплифицируемую ДНК. Разрезание амплифицированных фрагментов в этих местах создает «липкие» концы, используемые при вшивании амплифицированной ДНК в клонирующий вектор. 🧪 **Полимеразная цепная реакция**



Дополнение 9–1 Мощный метод судебной экспертизы

Традиционно одним из самых точных способов для определения, находился ли человек на месте преступления, было снятие отпечатков пальцев. С разработкой технологии рекомбинантных ДНК появился еще более мощный метод — **снятие отпечатка ДНК** (этот метод также называют ДНК-типированием или ДНК-профилеированием). Этот метод был впервые описан английским генетиком Алемом Джеффрейсом в 1985 г.

Снятие отпечатка ДНК основано на **полиморфизмах нуклеотидной последовательности**, т. е. незначительных отличиях последовательности (как правило, это единичные изменения в парах оснований) у разных людей, в среднем одна пара оснований на 1000. У некоторой части человеческой популяции возникают отличия от прототипа геномной последовательности человека, и у каждого есть несколько таких отличий.

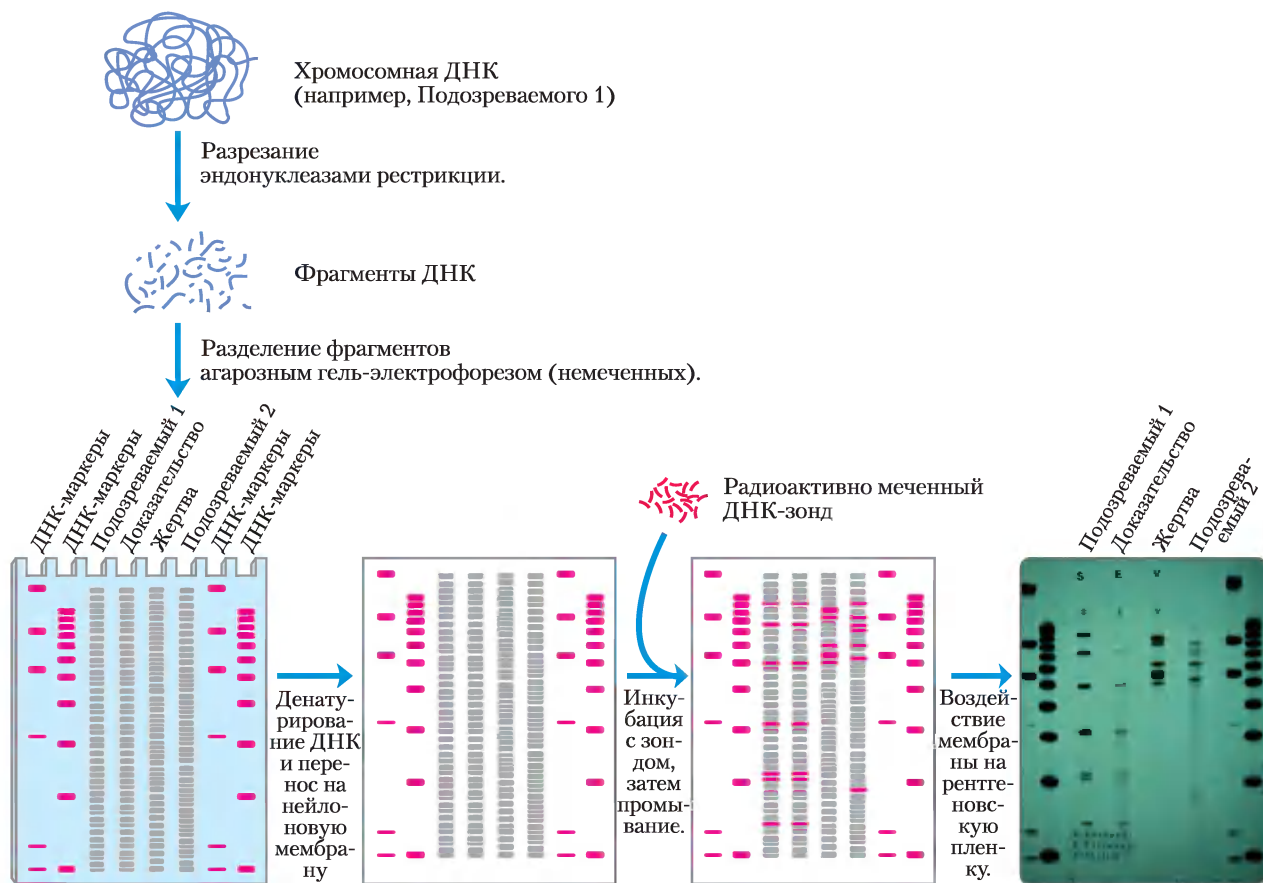


Рис. 1. Метод переноса по Саузеру для анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов. Метод переноса по Саузеру, или саузерн-блоттинг, использующийся в молекулярной биологии для решения самых разных задач, назван по имени его создателя Джереми Саузерна. В данном примере из судебной практики ДНК из спермы, обнаруженной на теле изнасилованной и убитой жертвы, сравнивали с образцами ДНК жертвы и двух подозреваемых. Каждый образец ДНК расщепили на фрагменты и разделили в геле методом электрофореза. Для идентификации фрагментов использовали радиоактивно-меченный ДНК-зонд, комплементарный участку последовательности определенного фрагмента. Размеры идентифицированных фрагментов ДНК жертвы и двух подозреваемых различались между собой. Как видно, расположение полос ДНК одного из подозреваемых идентично таковому для образца ДНК, взятой на месте преступления.

Некоторые изменения в последовательности происходят на участках, распознаваемых рестриктазами. Это приводит к тому, что размеры фрагментов ДНК, образующихся при разрезании одной эндонуклеазой рестрикции, различаются. Такие отличия называются **полиморфизмами длины фрагментов рестрикции** (RFLP, от *англ. restriction fragment length polymorphisms*). Для идентификации ДНК часто используют еще один тип последовательности — **короткие тандемные повторы** (*short tandem repeats, STR*).

Обнаружение RFLP основывается на специальном методе гибридизации под названием **саузерн-блоттинг** (от *англ. southern blotting*; рис. 1). Фрагменты, полученные при разрезании геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции, разделяют по размерам электрофорезом, денатурируют добавлением щелочи в агарозный гель, а затем переносят на нейлоновую мембрану для воспроизведения распределения фрагментов в геле. Мембрану погружают в раствор с радиоактивно меченым ДНК-зондом. Из последовательности, которая неоднократно повторяется в

геноме человека, зонд обычно распознает несколько из тысяч фрагментов ДНК, образующихся при разрезании генома эндонуклеазой рестрикции. Авторадиография отображает фрагменты, с которыми гибридизуется зонд, так же как и на рис. 1. Этот метод очень точный; он начал использоваться в судебной экспертизе в конце 1980-х гг. Однако для проведения анализа требуется много недеградированной ДНК (>25 нг). Такое количество ДНК на месте преступления или катастрофы часто не удается обнаружить.

В более чувствительных методах идентификации ДНК используются возможности полимеразной цепной реакции (ПЦР; см. рис. 9-16), а также анализ STR. Короткий тандемный повтор — это короткая последовательность ДНК, повторяющаяся несколько раз в определенных участках хромосомы; чаще всего последовательность содержит четыре пары нуклеотидов. Наиболее полезные для идентификации участки ДНК обычно содержат от 4 до 50 повторов (всего от 16 до 200 пар нуклеотидов в случае тетра-нуклеотидных повторов) и в человеческой популяции могут иметь

Таблица 1 Характеристики участков, использованных для составления американских стандартов CODIS

Локус	Хромосома	Повтор	Длина повтора (разброс)*	Число изученных аллелей**
CSF1PO	5	TAGA	5–16	20
FGA	4	CTGT	12,2–51,2	80
TH01	11	TCAT	3–14	20
TPOX	2	GAAT	4–16	15
VWA	12	[TCTG][TCTA]	10–25	28
D3S1358	3	[TCTG][TCTA]	8–21	24
D5S818	5	AGAT	7–18	15
D7S820	7	GATA	5–16	30
D8S1179	8	[TCTA][TCTG]	7–20	17
D13S317	13	TATC	5–16	17
D16S539	16	GATA	5–16	19
D18S51	18	AGAA	7–39,2	51
D21S11	21	[TCTA][TCTG]	12–41,2	82
Амелогенин	X,Y	Неприменимо		

Источник: из Butler, J.M. (2005) *Forensic DNA Typing*, 2nd edn, Academic Press, San Diego, p. 96.

* Длина повторов в человеческой популяции. В некоторых аллелях могут встречаться частичные или неточные повторы.

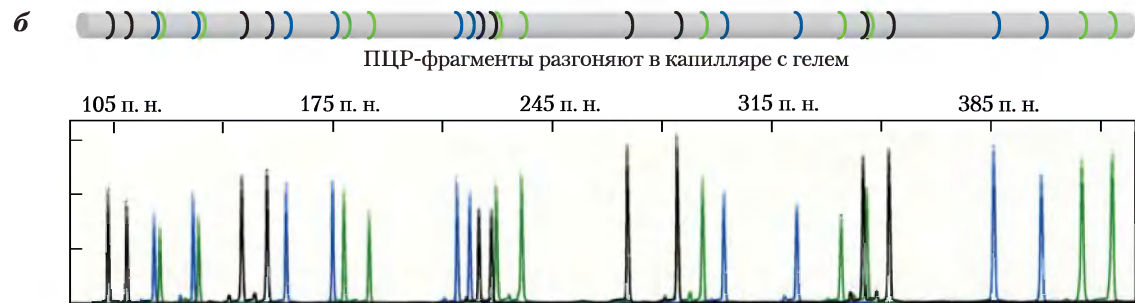
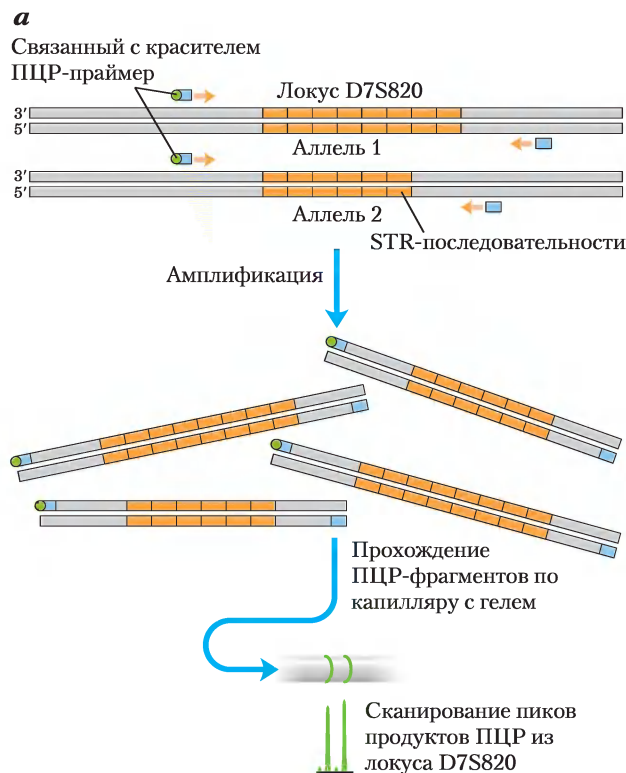
** Число разных аллелей в человеческой популяции, изученных на данный момент. Тщательный анализ локусов многих людей — необходимое условие для использования ДНК-типирования в криминалистике.

Дополнение 9–1 Мощный метод судебной экспертизы (продолжение)

разную длину. В геноме человека охарактеризовано свыше 20 000 тетра-нуклеотидных повторов. По оценкам, всего в геноме человека может содержаться свыше миллиона STR различных типов, что составляет около 3% всей геномной ДНК.

В анализе STR применяют полимеразную цепную реакцию. В судебной медицине уже давно (в начале 1990-х гг.) очевидно преимущество анализа STR по

сравнению с анализом полиморфизма длины рестриционных фрагментов в связи с более высокой чувствительностью метода. Последовательности ДНК, ограничивающие STR, уникальны для каждого типа повтора и идентичны (за исключением очень редких мутаций) у всех людей. Для ПЦР используют праймеры, связывающиеся с этими последовательностями и позволяющими амплифицировать ДНК tandemного повтора (рис. 2, а).



16-plex

Рис. 2. ПЦР-анализ локусов STR. а) Праймеры для ПЦР сконструированы таким образом, чтобы амплифицировать фрагмент ДНК, содержащий повтор. Один из двух праймеров связан с флуоресцентным красителем (зеленый кружок). Две хромосомы человека могут иметь аллели с разным числом повторов в одном и том же локусе. Поэтому при ПЦР могут образоваться два продукта слегка различающегося размера. Эти продукты разделяют с помощью очень тонкого полиакриламидного геля в капиллярной трубке. Образующиеся полосы анализируют на флуориметре и получают набор пиков. При сравнении этого набора с маркерами удастся определить размер каждого продукта ПЦР и, следовательно, длину STR соответствующего аллеля. б) Сочетание продуктов ПЦР от нескольких локусов создает сложный рисунок, как тот, что изображен здесь. (В данном случае это коммерческий набор для анализа STR, содержащий последовательности из 16 локусов, так называемый 16-plex.) Для такого анализа нужно несколько наборов праймеров — по одному набору для каждого локуса. Для облегчения идентификации локусов праймеры связаны с метками различного цвета. Кроме того, ПЦР-праймеры для каждого локуса подобраны таким образом, чтобы диапазон размеров получающихся продуктов отличался как можно сильнее от тех, что получаются с другими праймерами.

Таким образом, длина продукта ПЦР соответствует длине tandemного повтора в образце. Поскольку каждый человек наследует по одной хромосоме от каждого родителя, длины tandemных повторов на двух хромосомах часто различны, в результате чего при анализе ДНК одного человека получают два сигнала. Если анализировать участки STR, расположение полос, получаемое при снятии отпечатков ДНК, индивидуально для каждого человека. Метод ПЦР позволяет получать отпечатки даже частично разрушенной ДНК при массе образца менее 1 нг, например из единственного волосного фолликула, капли крови, следов спермы, найденной на жертве изнасилования, или из образцов ДНК давностью в несколько месяцев или даже лет.

Для успешного использования анализа коротких tandemных повторов в судебной практике необходимы стандарты. Первый такой стандарт был разработан в Великобритании в 1995 г. Американский стандарт CODIS (*COmbined DNA Index System*), был введен в 1998 г. В стандарте CODIS используется 13 хорошо изученных участков STR (табл. 1); в США этот контроль обязателен при любых анализах ДНК. В качестве маркера также используется ген амелогенина. Фланкирующие последовательности этого гена, расположенного на половых хромосомах человека, на X- и Y-хромосомах несколько различаются. Поэтому при амплификации гена амелогенина методом ПЦР образуются продукты разного размера, что позволяет определить пол донора ДНК. Банк данных CODIS к 2006 г. содержал 2,8 млн образцов и был доступен в любом штате. По данным на 2005 г., к этой базе данных обращались при более чем 25 000 судебных разбирательствах.

Существуют удобные наборы, позволяющие амплифицировать 16 и более локусов STR в одной пробирке. В такие наборы (рис. 2, б) входят уникальные для каждого локуса ПЦР-праймеры. Каждый праймер синтезирован таким образом, чтобы не происходило гибридизации с другим праймером в данном наборе и чтобы в ПЦР образовывались продукты разного размера, что позволяет в процессе электрофореза разнести сигналы от разных локусов. Праймеры связаны с красителями, помогающими различить продукты ПЦР. Наиболее широко применяющийся в настоящее время набор содержит 13 локусов из банка CODIS, амелогенин и два дополнительных локуса (т. е. всего 16), используемые во всем мире при проведении судебных экспертиз. Такие наборы чрезвычайно полезны для установления личности. При наличии хорошего профиля ДНК вероятность совпадения сигналов для двух людей во всей человеческой популяции меньше $1 : 10^8$.

Метод ДНК-типирования характеризуется высокой достоверностью. Такие анализы проводят как при осуждении, так и при оправдании подозреваемых, а также в иных ситуациях при установлении происхождения ДНК. Значимость этих анализов в судопроизводстве продолжает возрастать, так как методики прошли стандартизацию и законодательно рекомендованы для применения в криминалистических лабораториях. Даже убийства, совершенные несколько десятилетий назад, теперь можно раскрыть. Так в 1996 г. были идентифицированы останки последнего русского императора Николая II и его семьи, убитых в 1918 г., по отпечаткам ДНК, полученным из костей.

На основе нуклеотидных последовательностей генома создаются самые большие генетические библиотеки

Геном является самым большим источником информации об организме, и нет такого генома, который интересовал бы нас больше нашего собственного. Менее чем через 10 лет после введения в практику методов секвенирования ДНК начались серьезные обсуждения перспектив секвенирования всех 3 млрд пар нуклеотидов генома человека. Международный проект «Геном человека» стартовал после выделения существенного

финансирования в конце 1980-х гг. В развитие проекта значительный вклад внесли 20 секвенирующих центров в шести странах: США, Великобритании, Японии, Франции, Китае и Германии. Основная координация осуществлялась Исследовательским центром генома в Национальном институте здоровья (США) вначале под руководством Джеймса Уотсона, а после 1992 г. — Френсиса Коллинза. Вначале задача определения последовательности $3 \cdot 10^9$ п. н. генома казалась титанической работой, но постепенно она стала приводить к технологическим успехам. Полная последовательность генома человека была опу-

бликована в апреле 2003 г., на несколько лет раньше намеченного срока.

Этот успех — результат тщательно спланированной работы многих ученых при тесном международном сотрудничестве на протяжении 14 лет. Исследовательские группы впервые создали подробную карту генома человека, причем клоны, полученные из каждой хромосомы, организовывали в серию длинных контигов (рис. 9-17). Каждый контиг содержал ориентиры в форме STS на расстоянии менее 100 000 п. н. Картированный таким образом геном можно было поделить среди международных секвенирующих центров, причем каждый центр секвенировал картированные ВАС- или YАС-клоны, соответствующие опреде-

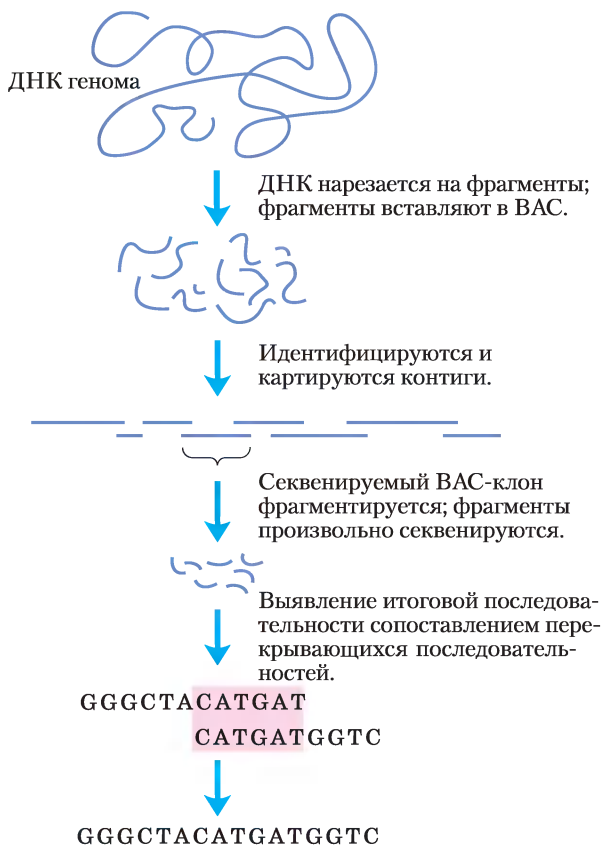


Рис. 9-17. Стратегия проекта «Геном человека». Полученные из геномной библиотеки клоны размещались в соответствующем порядке на подробной генетической карте, а затем отдельные клоны секвенировались методом *shotgun*. Методики секвенирования, применяемые для коммерческих целей, позволили отказаться от создания генетической карты и секвенировать целый геном клонированием по методу *shotgun*.

ленным сегментам генома. Из-за того что многие клоны имели длину более 100 000 п. н., а методы секвенирования могли распознать всего лишь от 600 до 750 п. н. нуклеотидной последовательности за раз, каждый клон надо было секвенировать по частям. Стратегия секвенирования основывалась на принципе *shotgun* («выстрел из дробовика»), в котором исследователи использовали новые мощные секвенаторы для определения последовательностей произвольных сегментов данного клона, а затем объединяли их всех вместе с помощью компьютерной идентификации перекрываний. Число секвенированных образцов клона подсчитывалось статистически, так что весь клон целиком определялся в среднем 4–6 раз. Затем из баз данных брали секвенированную ДНК для сборки целого генома. Создание генетической карты было трудоемкой задачей, ход этой работы сопровождался ежегодными отчетами в основных журналах на протяжении 1990-х гг., к концу десятилетия карта была составлена почти полностью. Завершение всего проекта по определению нуклеотидной последовательности генома человека первоначально было запланировано на 2005 г., но материальные и технические вложения ускорили процесс.

Коммерческий вклад в расшифровку генома человека был инициирован только что организованной в 1997 г. *Celera Corporation*. Эта научная группа под руководством Дж. Крэйга Вентера воспользовалась иной стратегией под названием «секвенирование целого генома методом *shotgun*», который исключил этап сборки карты генома. Вместо этого были секвенированы сегменты ДНК, взятые произвольным образом из всего генома. Секвенированные сегменты упорядочивались путем компьютерной идентификации перекрывающихся последовательностей (при этом обращений к подробной геномной карте государственного проекта было немного). В начале проекта «Геном



Френсис С. Коллинз



Дж. Крэйг Вентер

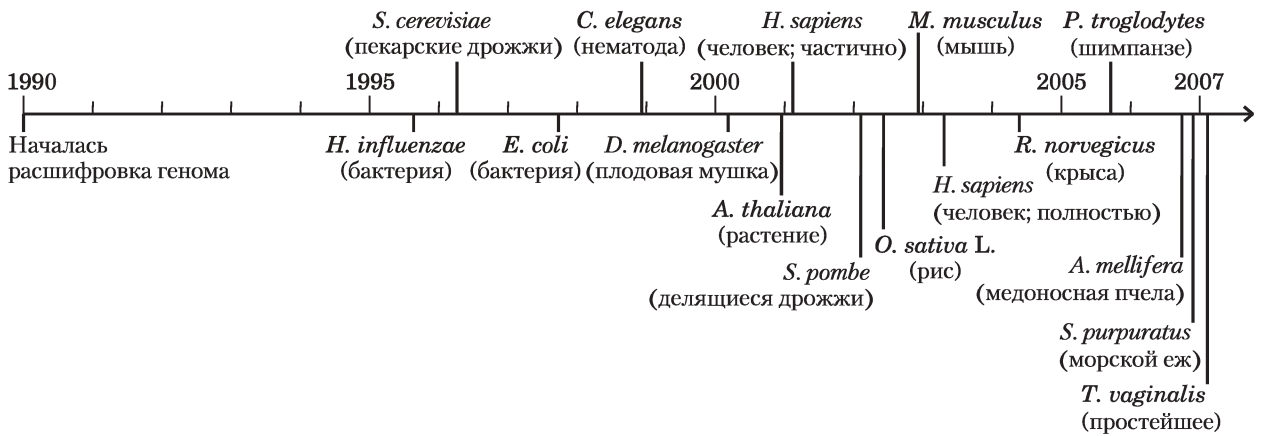


Рис. 9-18. Временная шкала секвенирования генома. Дискуссии в середине 1980-х гг. привели к тому, что начало проекта состоялось только в 1989 г. Предварительная работа, включавшая составление полной генетической карты и предоставление геномных ориентиров, заняла большую часть 1990-х гг. Были запущены также отдельные проекты по секвенированию геномов других организмов, необходимых для исследовательской практики. В настоящее время завершена расшифровка геномов многих видов бактерий (например, *Haemophilus influenzae*), дрожжей (*S. cerevisiae*), нематоды (*C. elegans*), насекомых (*D. melanogaster* и *Apis mellifera*) и растений (*A. thaliana* и *Oryza sativa L.*), грызунов (*Mus musculus* и *Rattus norvegicus*), приматов (*Homo sapiens* и *Pan troglodytes*) и некоторых возбудителей половых инфекций человека (например, *Trichomonas vaginalis*). У каждого геномного проекта есть сайт в Интернете, который служит центральным хранилищем данных.

человека» масштабное секвенирование методом shotgun казалось далеким от практической реализации. Однако усовершенствования компьютерного программного обеспечения и автоматизации секвенирования сделали к 1997 г. такой подход осуществимым. Соревнование в секвенировании между частными и государственными лабораториями существенно сэкономило время и приблизило окончание проекта. За публикацией в 2006 г. предварительных данных о нуклеотидной последовательности генома человека последовали два года завершающих работ по устранению примерно тысячи нестыковок, чтобы предоставить высококачественные данные о последовательности, которые согласовались бы между собой по всему геному.

Проект «Геном человека» ознаменовал кульминацию биологии XX в. и предвещает совсем иную науку в следующем веке. Геном человека является всего лишь одним из этапов исследований, поскольку наряду с ним расшифровываются (или уже расшифрованы) геномы многих других видов, в том числе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (расшифровка завершена в 1996 г.) и *Schizosaccharomyces pombe* (2002), нематоды

Caenorhabditis elegans (1998), плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (2000), растения *Arabidopsis thaliana* (2000), мыши *Mus musculus* (2002), рыбы-зебры и множества видов бактерий и архей (рис. 9-18). Ранние попытки расшифровки генома были сфокусированы в основном на видах, обычно используемых в лабораторных целях. Технология развивается, так что к моменту выхода этой книги станут известны полные последовательности геномов свыше 1200 организмов самых разных видов. Сегодня уже предпринимаются широкомасштабные попытки картирования генов, обнаружения новых белков и генов, ответственных за заболевания, а также многие другие проекты.

В результате исследований была создана база данных с таким потенциалом, который может не только привести к быстрому прогрессу биологии, но и изменить само представление людей о самих себе. Первые наши впечатления от расшифровки генома человека колебались от ощущения запутанности до осознания глубокой мудрости природы. Мы не настолько сложны, как думаем об этом. Оценки, сделанные несколько десятков лет назад, что у человека примерно 100 000 генов,

распределенных среди $3,2 \cdot 10^9$ п. н. генома, не оправдались: у нас всего лишь от 25 000 до 30 000 генов. Это, судя по всему, в полтора раза больше, чем у дрозофилы (20 000 генов), и несколько больше, чем у нематоды (23 000). Несмотря на то что человек появился в ходе эволюции сравнительно недавно, геном наш очень стар. Из 1278 семейств белков, обнаруженных в одном древнем слое, только 94 были уникальными для позвоночных. Однако хотя многие типы белковых доменов у нас общие с растениями, червями и плодовыми мушками, но используем мы их в более сложных механизмах. Альтернативные пути экспрессии генов (гл. 26) дают возможность получения более одного белка с одного гена; этот процесс встречается у людей и других позвоночных чаще, чем у бактерий, червей или любых других форм жизни. Это способствует большей сложности белков, образующихся из нашего генного комплекта.

Теперь стало известно, что только от 1,1% до 1,4% нашей ДНК действительно кодирует белки (рис. 9-19). Больше 50% нашего генома состоит из коротких повторяющихся последовательностей, подавляющее большинство которых — около 45% нашего генома в целом — происходят из транспозонов, небольших мобильных последовательностей ДНК, являющихся молекулярными паразитами (гл. 25). Большинство транспозонов находилось в нашем геноме продолжительное время и теперь настолько изменились, что больше не

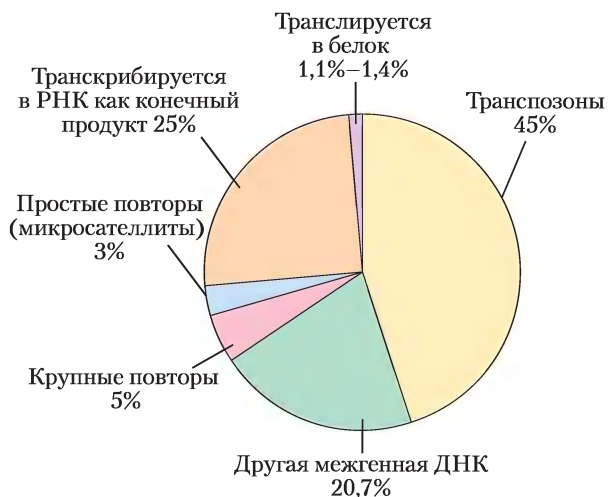


Рис. 9-19. Структура генома человека. На диаграмме показаны доли различных видов последовательностей в нашем геноме.

могут перемещаться на новые участки. Остальные все еще активно движутся с низкой периодичностью, делая геном динамичным и развивающимся. Наконец, немногочисленные транспозоны были приняты своим хозяином и, по-видимому, выполняют важные клеточные функции.

Что же можно сказать на основе всей этой информации о том, насколько один человек отличается от другого? В пределах человеческой популяции существуют миллионы отличий в одно основание ДНК, называемых **однонуклеотидными полиморфизмами**, или **SNPs** (от англ. *single nucleotide polymorphisms*, произносится как «снипсы»). Каждый человек отличается от другого одной парой оснований на каждую тысячу. Из этих небольших генетических отличий возникает наше разнообразие, о котором мы все знаем: цвет волос и глаз, аллергия на лекарства, размер стопы и даже (до некоторой неизвестной пока степени) наше поведение. Некоторые SNPs связаны с определенными человеческими популяциями и могут дать важную информацию о миграциях человека, которые происходили тысячи лет назад, и о нашем более отдаленном эволюционном прошлом.

Как эта информация помогает нам понять, что именно делает человека человеком? Ответы на некоторые вопросы можно найти на основании анализа генома нашего ближайшего родственника — шимпанзе. Геномы человека и шимпанзе различаются по нуклеотидному составу лишь на 1,2%, а по составу генов, кодирующих белки, различие еще меньше. Кажется, что это немного, однако в таких больших геномах это различие составляет около 35 млн п. н., еще 5 млн коротких вставок или делеций и довольно большое число более протяженных геномных перестановок. Далеко не простое дело — выяснить, какие же из этих различий ответственны за отличия человека от шимпанзе на фенотипическом уровне. Анализ генома приматов может оказать значительную помощь в понимании биохимической организации и эволюции человека, однако решение этой задачи пока находится в самом начале пути.

Насколько бы впечатляющим ни был успех, расшифровка генома человека сама по себе не так трудна по сравнению с тем, что следует сделать дальше — попытаться осознать *всю* информацию, хранящуюся в геноме. Геномные последовательности, ежемесячно добавляемые в международную базу данных, являются «дорожными картами», ча-

сти которых написаны на языке, который мы еще не знаем. Но они приносят огромную пользу, способствуя открытию новых белков и процессов, оказывающих влияние на каждый аспект биохимии. Это мы постараемся прояснить в следующих главах.

Краткое содержание раздела 9.2 ОТ ГЕНОВ К ГЕНОМАМ

- Наука геномика занимается активным изучением геномов и их «содержимым».
- Сегменты ДНК генома можно собрать в библиотеки — например, генные банки и библиотеки кДНК — с огромным диапазоном целей и задач.
- Для амплификации отдельных сегментов ДНК из библиотеки ДНК или целого генома можно использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР).
- Объединенным усилием международных исследовательских коллективов удалось полностью расшифровать геномы многих организмов, включая человека, и информация о них теперь доступна в публичных базах данных.

9.3. От геномов к протеомам

Ген — не просто последовательность ДНК; это информация, которая преобразуется в полезный продукт — белок или функциональную молекулу РНК, когда это нужно клетке и если это нужно клетке. Первым и наиболее очевидным шагом при исследовании последовательностей генома является составление каталога продуктов генов. Гены, кодирующие РНК в качестве окончательного продукта, несколько труднее идентифицировать, чем белок-кодирующие гены, а в геноме позвоночных очень трудно определить даже белок-кодирующие гены. Изучение информации, которую таит в себе последовательность ДНК, привело к неожиданному заключению. Несмотря на многие годы успехов биохимии, в каждой эукариотической клетке остались тысячи белков (и довольно много у бактерий), о которых нам ничего не известно. Эти белки могут участвовать в еще не открытых процессах или содействовать неизвестным образом процессам, о

которых, как нам кажется, все известно. Вдобавок к этому геномные последовательности ничего нам не говорят о трехмерной структуре белков или о том, как белки модифицируются после синтеза. Белки со своими бесчисленными и незаменимыми функциями в клетке становятся центром новых стратегий развития всей биохимии клетки.

Множество белков, экспрессируемых геномом, называется его **протеомом**; этот термин впервые появился в научной литературе в 1995 г. Затем быстро развилась новая область знаний под названием **протеомика**. Задача, которую должна решать протеомика, очевидна, хотя решения еще нет. В каждом геноме есть тысячи генов, кодирующих белки, и в идеале мы хотим знать структуру и свойства всех этих белков. Принимая во внимание, что многие белки преподносят сюрпризы даже после многолетнего изучения, исследование целого протеома становится пугающим предприятием. Простое определение функций новых белков требует интенсивной работы. Но теперь биохимики могут использовать рациональные методы, располагая множеством новых и усовершенствованных технологий.

Функции белков можно описать на трех уровнях. **Фенотипическая функция** характеризует эффекты белков на целый организм. Например, нехватка белка может привести к замедлению роста организма, к измененному характеру развития или даже к смерти. **Клеточная функция** характеризует сеть взаимодействий с участием белков на клеточном уровне. Взаимодействия с другими белками в клетке помогают устанавливать типы метаболических процессов, в которых белок принимает участие. Наконец, **молекулярная функция** относится к определенной биохимической активности белка со всеми тонкостями, например к реакциям ферментативного катализа или к лиганд-рецепторным взаимодействиям.

Для некоторых геномов, таких как у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и у растения *Arabidopsis*, распространенным подходом является инактивация каждого гена методами генной инженерии и исследование этого действия на организм. Если характер роста или другие свойства организма меняются (или если рост вообще не наблюдается), это позволяет судить о фенотипической функции белкового продукта гена.

Есть также три других основных способа изучить функционирование белков: 1) последова-

тельное и структурное сравнение с генами и белками, функции которых уже известны, 2) выяснение, когда и где экспрессируется ген, и 3) исследование белок-белковых взаимодействий. Рассмотрим каждый из этих подходов по очереди.

Многие из подходов, разработанных для изучения функций отдельных белков, можно применить к анализу белков одновременно. Развивающаяся область науки **системная биология** рассматривает множество биохимических процессов в клетке, включая изменение белкового состава клетки, при изменениях условий окружающей среды или при генетическом стрессе. В данной книге при описании тех или иных биохимических или генетических методов мы указываем на возможность их применения для решения задач системной биологии.

Взаимосвязи структуры и последовательности белка дают информацию о его функциях

Быстрое накопление информации о последовательностях геномов в значительной степени расширило наше понимание процессов эволюции (см. разд. 3.4, с. 156). Другой важной причиной секвенирования многих геномов является создание базы данных, которую можно использовать для установления функций генов сравнением геномов, и такое направление называется **сравнительной геномикой**. Иногда у только что открытого гена есть гомологическое сходство последовательности с ранее изученным геном у того же или другого вида, и поэтому его функцию можно полностью или частично определить на основе такой связи. Гены, обнаруженные у разных видов, но обладающие явным сходством последовательности и функций, называются **ортологами**. Гены, связанные друг с другом подобным образом в пределах одного вида, называются **паралогами** (с. 61). Если функция гена уже была установлена у одного вида, то эту информацию можно использовать для определения функции гена у ортолога, найденного в другом виде. Сходство легче всего обнаружить, сравнивая геномы относительно близкородственных видов, например мыши и человека, хотя много явно ортологичных генов было обнаружено у таких дальних видов, как бактерия и человек. Иногда сохраняется даже расположение генов на хромосоме в больших сегментах геномов близкородственных видов (**рис. 9-20**). Сохраняющееся расположение

Человек 9	Мышь 2
<i>EPB72</i>	<i>Epb7.2</i>
<i>PSMB7</i>	<i>Psmb7</i>
<i>DNM1</i>	<i>Dnm</i>
<i>LMX1B</i>	<i>Lmx1b</i>
<i>CDK9</i>	<i>Cdk9</i>
<i>STXBPI</i>	<i>Stxbp1</i>
<i>AK1</i>	<i>Ak1</i>
<i>LCN2</i>	<i>Lcn2</i>

Рис. 9-20. Синтения в геномах мыши и человека. Большие сегменты геномов мыши и человека имеют близкородственные гены, расположенные на хромосоме в одном и том же порядке, и такая связь называется синтением. Изображены сегменты 9-й хромосомы человека и 2-й хромосомы мыши. Гены в этих сегментах обладают высокой степенью гомологичности и одинаковым порядком следования. Различия в написании названий генов отражают разные правила обозначения одних и тех же генов в этих организмах.

генов, называемое **синтением**, еще раз свидетельствует об ортологической связи между генами на одинаковых участках родственных сегментов.

С другой стороны, последовательности, связанные с определенными структурными мотивами белка (гл. 4), можно выявить в нем самом. Присутствие структурного мотива может означать, что белок, скажем, катализирует гидролиз АТФ, связывается с ДНК или образует комплекс с ионами цинка, что помогает определить молекулярную функцию. Такие связи определяются с помощью постоянно совершенствующихся компьютерных программ, и лимитирует этот процесс только имеющаяся информация о гене и структуре белка и наша способность связать последовательности с определенными структурными мотивами.

Для установления функций на основе структурных взаимосвязей был начат широкомасштабный проект по структурной протеомике. Цель его заключается в кристаллизации и определении структуры как можно большего числа белков и белковых доменов, зачастую обладая минимальной или вообще не имея никакой информации об их функции. Проекту способствовала автоматизация некоторых утомительных этапов кристаллизации белка (см. доп. 4-5). Как только выясняется струк-

тура, она становится доступной в базах данных структур, о которых говорилось в гл. 4. Такой подход должен помочь определить степень вариации структурных особенностей. Если выясняется, что у только что открытого белка имеются структурные элементы, которые однозначно напоминают структурные мотивы с известной функцией из базы данных, то на основе этой информации можно предположить молекулярную функцию такого белка.

Паттерны клеточной экспрессии могут прояснить функцию гена в клетке

В каждом вновь расшифрованном геноме исследователи находят кодирующие белки гены, не имеющие однозначных структурных взаимосвязей с уже известными генами или белками. В этих случаях для получения информации о функции гена можно использовать другие подходы. Выяснение того, в каких тканях экспрессируется ген или при каких условиях происходит образование генного продукта, может снабдить нас драгоценными ключами к разгадке. Для изучения таких паттернов было разработано много разных методик.

Двумерный гель-электрофорез. Как показано на рис. 3-21, с помощью двумерного гель-электрофореза можно обнаружить и разделить до 1000 различных белков в одном геле. Затем можно использовать масс-спектрометрию (см. доп. 3-2), чтобы частично определить области отдельных белков и сопоставить каждый белок с соответствующим ему геном. Помочь определить функцию гена в клетке может появление и не появление (или исчезновение) областей определенных белков в пробах из различных тканей, из одинаковых тканей на разных этапах развития или из тканей, обработанных способами, имитирующими множество биологических условий.

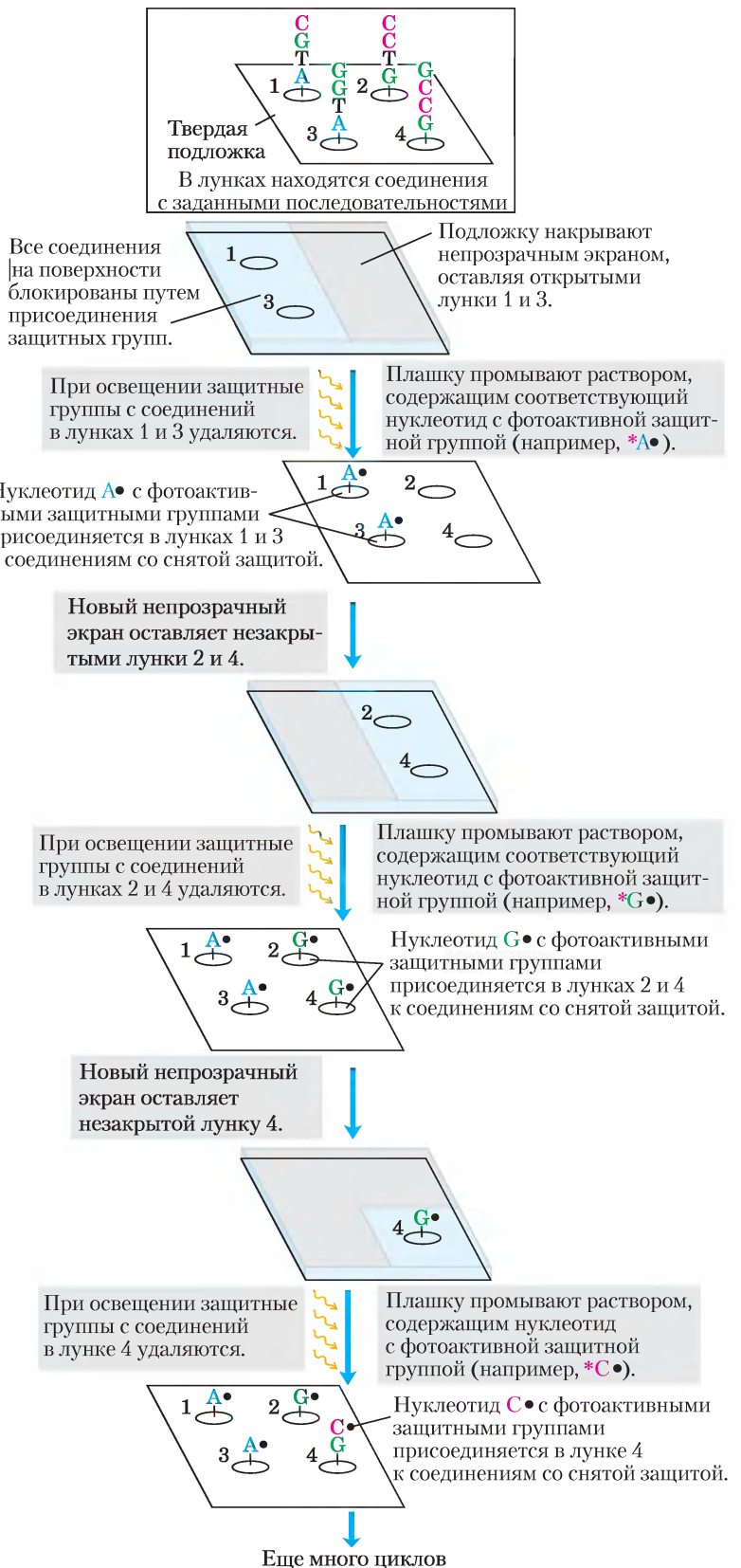
На таких гелях одновременно можно увидеть большое количество различных белков, поэтому данный метод используется в системной биологии. Например, патогенная бактерия может измениться таким образом, что станет устойчивой к действию одного или нескольких антибиотиков. Существует высокая вероятность того, что белковый состав такой бактериальной клетки изменится.

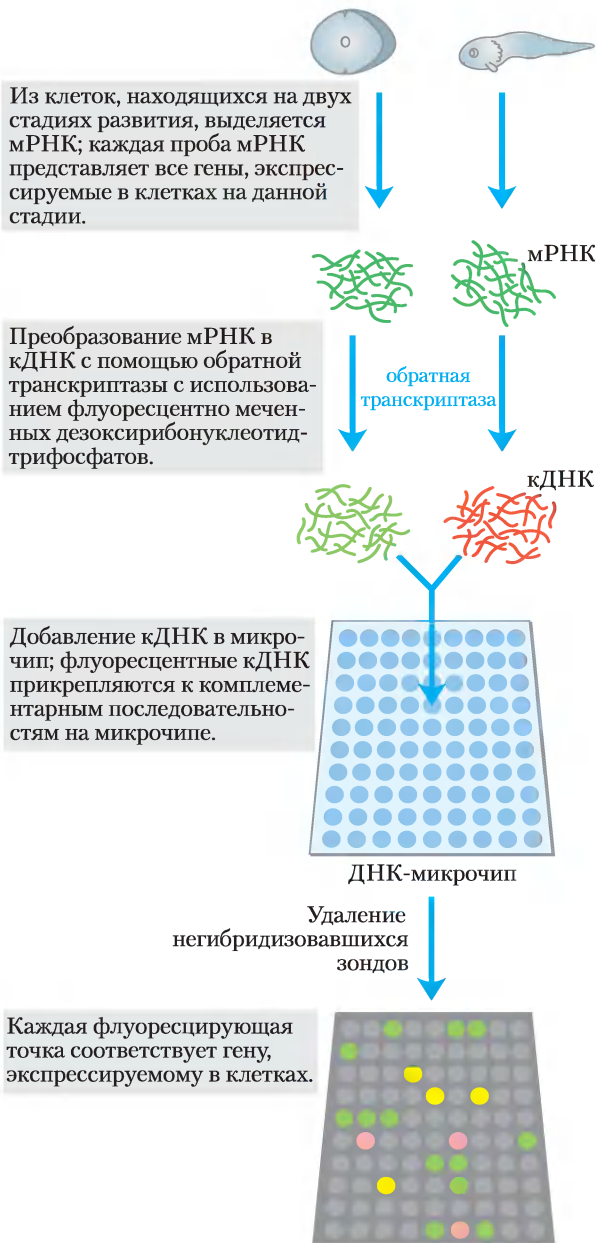
ДНК-микрочипы. Основные усовершенствования технологии, лежащей в основе библиотек ДНК,

ПЦР и гибридизации, объединились при создании **ДНК-микрочипов** (называемых иногда просто **ДНК-чипами**), которые позволяют осуществлять быстрый и одновременный скрининг нескольких тысяч генов. При использовании автоматизированных устройств, которые очень точно наносят нанолитровые количества раствора ДНК, сегменты ДНК известных генов длиной от нескольких десятков до сотен нуклеотидов амплифицируют с помощью ПЦР и помещают на твердую подложку. В специально разработанном чипе на площади поверхности всего в несколько квадратных сантиметров размещается до миллиона таких капель. При альтернативном подходе ДНК синтезируется непосредственно на твердой подложке с использованием фотолитографии (рис. 9-21). После приготовления чипа его можно зондировать с помощью мРНК или кДНК из определенного типа клеток или клеточной культуры для идентификации генов, которые в них экспрессируются.

Использование микрочипов позволяет ответить на вопросы о том, какие гены экспрессируются на каждой стадии развития организма. Из клеток на двух разных стадиях развития извлекают полный набор мРНК и преобразуют в кДНК с помощью обратной транскриптазы и флуоресцентно меченных дезоксирибонуклеотидов. Флуоресцентные кДНК смешивают и используют в качестве зондов, каждый из которых гибридизуют с комплементарными последовательностями на микрочипе. Например, на рис. 9-22 меченые нуклеотиды используют, чтобы кДНК для каждой пробы флуоресцировала двумя разными цветами. Затем кДНК из двух проб смешивают и используют для зондирования микрочипа. Точки, флуоресцирующие зеленым цветом, соответствуют мРНК, которых больше всего на одноклеточной стадии; те же, которые флуоресцируют красным, соответствуют последовательностям, преобладающим на более поздних стадиях развития. мРНК, которые присутствуют на обеих стадиях развития в одинаковых количествах, флуоресцируют желтым цветом. Используя смесь двух проб для измерения относительного, а не абсолютного избытка последовательностей, метод вносит поправки на разброс в количествах ДНК, первоначально размещенных в каждой ячейке на подложке, и на другие возможные погрешности в ячейках на микрочипе. Флуоресцирующие ячейки дают снимок всех генов, экспрессируемых в клетках на момент отбора

Рис. 9-21. При изготовлении микрочипов для этого метода используют соединения, которые при активации светом (фотоактивации) могут присоединять нуклеотид (см. рис. 8-35, там использована нефотохимическая реакция присоединения активных групп к твердому носителю). В компьютер загружают информацию об олигонуклеотидных последовательностях, которые надо синтезировать в лунках 1–4. В начальный момент все реакционноспособные группы на поверхности плашки должны содержать фотоактивную защиту (•). Плашку покрывают непрозрачным экраном, в котором для лунок 1 и 3 оставлены отверстия — соединения в этих лунках должны присоединить заданный нуклеотид. Затем плашку освещают короткими вспышками, при этом в лунках 1 и 3 удаляются фотоактивные защитные группы. Поверхность плашки промывают раствором нуклеотида А с фотоактивной группой, способного реагировать по-своему 3'-гидроксилу (*), например *А•. Поскольку 5'-гидроксил защищен, нуклеотид присоединяется к поверхности в освещаемой зоне через свой 3'-гидроксил, и нежелательных реакций не происходит. Затем экран заменяют на другой с тем, чтобы можно было освещать лунки 2 и 4, где соединения должны принять нуклеотид G. Плашку вновь освещают короткими вспышками, теперь удаляя фотоактивные защитные группы с 5'-гидроксила, промывают плашку раствором нуклеотида *G•, который связывается на поверхности в лунках 2 и 4. Затем, используя последовательно первый и второй экраны, проводят обработку поверхности плашки другими фотоактивными нуклеотидами (*С• и *Т•), как описано выше для нуклеотидов А• и G•. Повторяют аналогичные операции до тех пор, пока на основе соединений в каждой лунке не будет построена заданная нуклеотидная последовательность. В каждой лунке возникает много нуклеотидных «хвостов», а не одна последовательность, как может показаться, если смотреть на наш рисунок. Кроме того, в чипе тысячи лунок (рис. 9-22), и в каждой лунке создается своя нуклеотидная последовательность.





образца, т. е. отражают экспрессию генов в целом геноме. Что касается генов с неизвестной функцией, то время и условия их экспрессии могут дать важные сведения об их роли в клетке.

Пример микрочипа (рис. 9-23) демонстрирует впечатляющие результаты, которых можно достичь. Сегменты каждого из более чем 6000 генов полностью расшифрованного генома дрожжей были по отдельности амплифицированы с помощью ПЦР, и каждый сегмент размещался на подложке в определенном месте, образуя показан-

◀ **Рис. 9-22. ДНК-микрочип.** Микрочип можно приготовить из любой известной последовательности ДНК, из любого источника, созданного химическим синтезом или с помощью ПЦР. ДНК размещается на твердой подложке (как правило, это специально обработанные стеклянные пластинки) с помощью автоматизированных устройств, способных нанести очень малые (нанолитровые) капли в точные местоположения. Под действием УФ-света происходит связывание ДНК с пластинками. Как только ДНК прикрепилась к поверхности, микрочип можно зондировать другими флуоресцентно мечеными нуклеиновыми кислотами. Здесь пробы мРНК взяты из клеток лягушки на двух стадиях ее развития. На основе нуклеотидов, флуоресцирующих разным цветом, для каждой пробы создают кДНК-зонды; для зондирования микрочипа используется смесь кДНК. Зеленые точки соответствуют мРНК, преобладающим на одноклеточной стадии; красные точки — последовательностям, чаще встречающимся на более поздних стадиях развития организма. Желтые точки указывают на примерно одинаковое количество мРНК на обеих стадиях. 🧪 **Синтез олигонуклеотидных чипов**

ный микрочип. Этот чип представляет собой, в некотором роде, снимок целого генома дрожжей.

Микрочипы — незаменимый инструмент в системной биологии; они позволяют анализировать изменения экспрессии генов на клеточном уровне. Объектом анализа может быть как один ген, так и целый геном. Тот же подход применим и для анализа изменений ДНК, таких как генетические изменения, возникающие в результате естественного отбора, или простые вариации в популяции. Если в популяции бактерий возникает новый фенотип, что говорит о наличии одной или нескольких мутаций, микрочипы позволяют быстро идентифицировать эти мутации. Для этого чип с ДНК бактерии дикого типа гибридизуют с ДНК из мутантных клеток. Там, где ДНК из клеток дикого типа и из мутантов различаются, гибридизации не происходит, что выражается в виде определенного сигнала. Установление полной нуклеотидной последовательности позволяет точно определить изменения, произошедшие в этом участке ДНК. Данный подход может использоваться в медицине, например для изучения новых штаммов вирусов или патогенных бактерий, устойчивых к действию антибиотиков.

🏥 Применение микрочипов уже достаточно активно происходит в тех областях медицины, которые связаны с изучением раковых за-

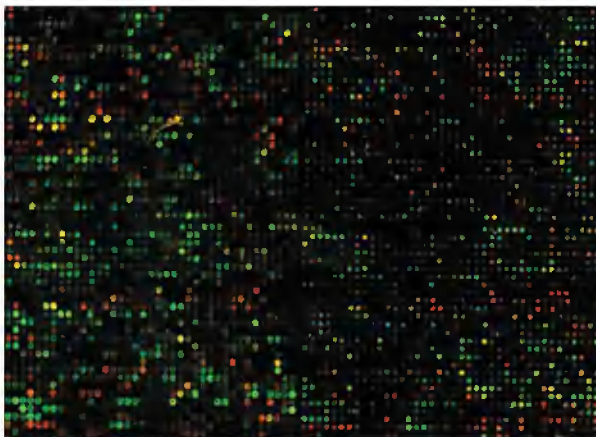


Рис. 9-23. ДНК-микрочипа, увеличенное изображение. Каждая светящаяся точка на микрочипе содержит ДНК одного из 6200 генов генома дрожжей (*S. cerevisiae*), причем каждый ген представлен в чипе. Микрочип зондировали флуоресцентно меченой нуклеиновой кислотой, полученной из мРНК, выделенной, (1) когда клетки росли в культуре нормально, и (2) после 5 часов после того, как клетки начали образовывать споры. Зеленые точки соответствуют генам, которые экспрессируются лучше всего во время нормального роста; красные точки — генам, которые экспрессируются преимущественно во время спорообразования. Желтые точки соответствуют генам, которые не меняют уровня своей экспрессии во время спорообразования. Изображение приведено с увеличением, на самом деле размеры микрочипа всего 1,8 × 1,8 см. 🧪 **Скрининг олигонуклеотидного чипа для получения паттерна генной экспрессии**

болеваний. Различные типы опухолевых клеток в организме человека (и даже в одной ткани) могут сильно различаться по скорости роста, способности образовывать метастазы и по реакции на проводимое лечение. Часто невозможно определить тип опухоли только на основании внешних признаков. Однако раковые клетки имеют характерный вид экспрессии генов, называемый транскрипционным профилем, который при различных видах рака имеет довольно выраженные особенности. Это может служить основой для определения типа опухоли. В качестве примера приведем явный прогресс, который происходит в области диагностики и лечения рака молочной железы. За последнее десятилетие в многочисленных клинических исследованиях с помощью микрочипов были определены транскрипционные профили нескольких тысяч типов рака молочной железы. Были созданы новые протоколы

лечения, а успехи и неудачи тщательно отслеживались. Были идентифицированы отдельные гены и группы генов, усиленная экспрессия которых (иногда в определенных комбинациях) может служить прогностическим фактором. В результате возникли большие базы данных, позволяющие на основании транскрипционного профиля составить прогноз и подобрать наиболее подходящий метод лечения. Такой подход уже довольно широко применяется в онкологических клиниках, а значение его по мере накопления новых данных будет еще больше возрастать — как для врачей, так и для пациентов. ■

Белковые чипы. Белки тоже можно разместить на твердой подложке и использовать для определения присутствия или отсутствия других белков в пробе. Например, исследователи готовят чип с антителами к определенным белкам, размещая их в виде отдельных ячеек на твердой подложке. Добавляют смесь белков, и если в ней присутствует белок, связывающийся с любым из антител, то тогда его можно обнаружить твердофазным ИФА (см. рис. 5-26, б). Разрабатывается также много других видов и приложений белковых чипов. Это еще один метод анализа, который можно использовать для изучения как одного белка, так и всех белков какой-либо биологической системы.

Белок–белковые взаимодействия помогают определить функцию молекул в клетке

Ключом к определению функции конкретного белка является выяснение того, с чем он связывается. В случае белок-белковых взаимодействий связь белка с неизвестной функцией с белком, функция которого хорошо изучена, может оказаться неоспоримым «обвинением в соучастии». И выявить эту связь можно разнообразными способами.

Сравнения геномного состава. Хотя и не дает доказательства прямой взаимосвязи, но подсказать функцию белка может всего лишь присутствие комбинации генов в определенных геномах. Можно просто отыскать геномы с определенными генами в базах данных, а затем выяснить, какие еще гены присутствуют в тех же самых геномах (рис. 9-24). Если в геноме два гена всегда встречаются вместе, это указывает на то, что белки, которые кодируются ими, функционально

Белок	Вид			
	1	2	3	4
P1	+	-	+	+
P2	-	-	+	-
P3	+	+	-	+
P4	+	-	+	-
P5	+	-	-	-
P6	+	+	-	+
P7	+	+	+	-

Рис. 9-24. Применение сравнительной геномики для выявления функционально связанных генов. Одно из применений сравнительной геномики заключается в приготовлении филогенетических профилей для выявления генов, которые в геноме всегда встречаются вместе. В этом примере показано сравнение генов четырех организмов, но на практике компьютерные поисковые системы могут охватить множество видов. Обозначения P1, P2 и т. д. относятся к белкам, которые кодируются каждым видом. В данном методе не требуются гомологичные белки. Поскольку в этом примере белки P3 и P6 в геноме всегда встречаются вместе, они могут быть функционально связаны. Для подтверждения этого вывода требуются дальнейшие исследования.

связаны. Подобные корреляции чрезвычайно полезны, если функция по крайней мере одного из белков известна.

Очистка белковых комплексов. Благодаря созданию библиотек кДНК, в которых каждый ген шит с эпитопным «хвостом» или тэгом (англ. *tag*), ученые могут получить иммунопреципитат белкового продукта гена при помощи антитела, которое связывается с эпитопом (рис. 9-15, б). Если меченый белок экспрессируется в клетке, то другие белки, которые связываются с ним, также можно осадить. Идентификация ассоциированных белков покажет некоторые из белок-белковых взаимодействий меченого белка. Существует много вариантов этого процесса. Например, гомогенат клеток, экспрессирующих меченый белок, наносят на колонку, содержащую иммобилизованное антитело. Меченый белок связывается с антителом, а белки, которые взаимодействуют с меченым белком, тоже удерживаются в колонке. Соединение между белком и тэгом разрывается специфичной

протеазой, а белковые комплексы элюируются из колонки и анализируются. Эти методы можно использовать для определения сложных сетей взаимодействий внутри клетки. Многие из концевых последовательностей, перечисленных в табл. 9-3, могут применяться в аналогичных хроматографических протоколах: средство концевой последовательности к специфическому лиганду используется для идентификации белков, способных связываться с определенным белком, в который встроена эта концевая последовательность.

Дрожжевая двугибридная система. Усовершенствованный генетический метод определения белок-белковых взаимодействий основан на свойствах белка Gal4 (Gal4p), активирующего транскрипцию определенных генов дрожжей (см. рис. 28-31). У белка Gal4p есть два домена, один из которых связывается со специфической последовательностью ДНК, а другой активирует РНК-полимеразу, синтезирующую мРНК из соседнего репортерного гена. По отдельности каждый из доменов стабилен, но для активации РНК-полимеразы необходимо взаимодействие с активационным доменом, которому в свою очередь нужно позиционирование ДНК-связывающим доменом. Таким образом, чтобы домены работали правильно, они должны быть расположены рядом (рис. 9-25, а).

В этом методе кодирующие белок участки изучаемых генов сливаются с кодирующими последовательностями либо ДНК-связывающего домена, либо активационного домена белка Gal4p, и получившиеся гены экспрессируют ряд слитых белков. Если белок, пришитый к ДНК-связывающему домену, взаимодействует с белком, пришитым к активационному домену, то начинается транскрипция. Репортерный ген, транскрибируемый при такой активации, как правило, кодирует белок, необходимый для клеточного роста, или фермент, катализирующий реакцию с окрашенным продуктом. Таким образом, при росте в подходящей среде клетки, которые содержат такую пару взаимодействующих белков, можно легко отличить от тех, которые ее не имеют. В большинстве случаев ген ДНК-связывающего домена Gal4p сливается со множеством генов в одном штамме дрожжей, а ген активационного домена Gal4p сливается со многими другими генами во втором штамме, затем штаммы дрожжей конъюгируют и выращивают колонии из отдель-

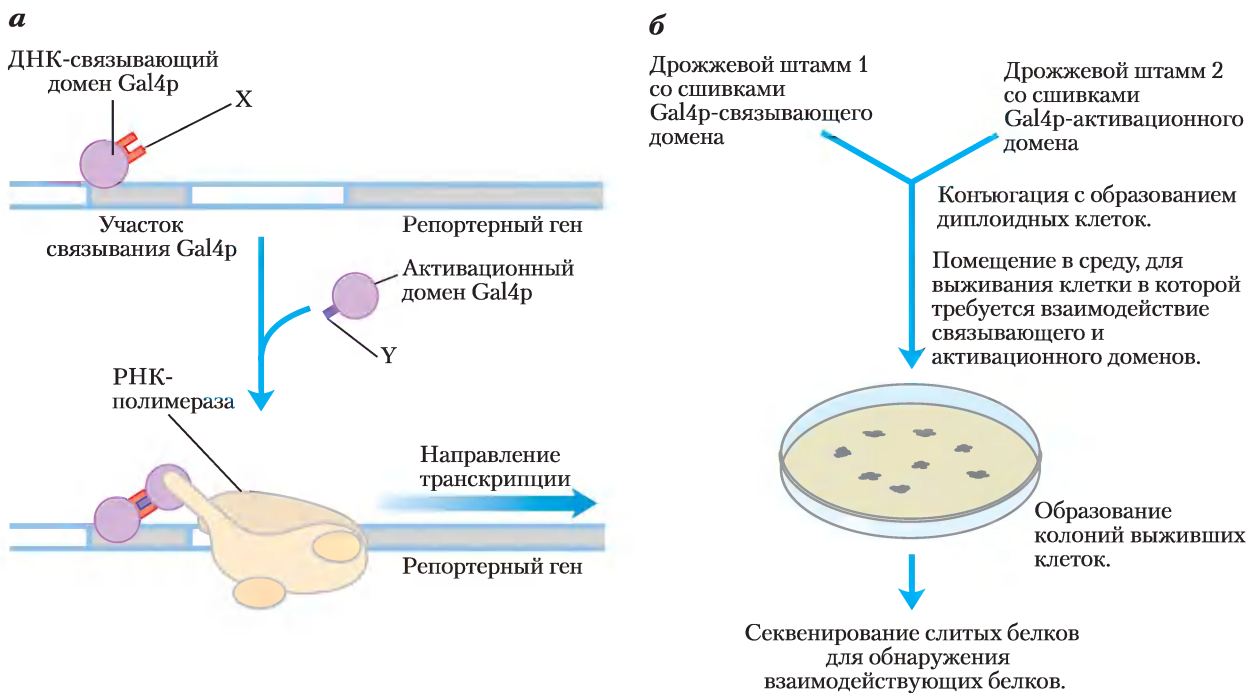


Рис. 9-25. Дрожжевая двугибридная система. а) В этой системе для определения белок-белковых взаимодействий происходит соединение ДНК-связывающего и активационного доменов белка Gal4 дрожжей благодаря взаимодействию двух белков X и Y, к которым присоединен каждый из доменов. Взаимодействие вызывает экспрессию репортерного гена. б) У разных штаммов дрожжей, которые затем подвергаются конъюгации, создаются две сшивки. Раствор конъюгата помещается в среду, в которой дрожжи не могут выжить, если у них не экспрессируется репортерный ген. Таким образом, у всех выживших колоний есть взаимодействующие пары слитых друг с другом белков. Секвенирование связанных белков у выживших клеток выявляет взаимодействующие белки. 🧪 **Дрожжевые двугибридные системы**

ных диплоидных клеток (рис. 9-25, б). Это позволяет осуществлять широкомасштабный скрининг взаимодействующих в клетке белков.

Все эти методы дают важные сведения о функции белка. Тем не менее они не исключают подходов классической биохимии. Они просто предоставляют исследователю свободный доступ ко многим новым важным биологическим проблемам. Наконец, для полного понимания функциональной роли любого нового белка необходимы традиционные биохимические методы, которые, например, использовались для идентификации многих хорошо изученных белков. В совокупности с постоянно развивающимися методами биохимии и молекулярной биологии геномика и протеомика ускоряет открытие не только новых белков, но и еще не известных биологических процессов и механизмов.

Краткое содержание раздела 9.3 ОТ ГЕНОМОВ К ПРОТЕОМАМ

- Протеом — совокупность белков, экспрессируемых геномом клетки. Новая область протеомики осуществляет попытку составления каталога и определения функций всех белков в клетке. Интегральный подход к анализу множества белков или других макромолекул в клетке иногда называют системной биологией.
- Один из наиболее эффективных способов выяснения функции нового гена осуществляется методами сравнительной геномики, т. е. поиском в базах данных генов с одинаковыми последовательностями. Паралоги и ортологи — это белки (и их гены) с явными сходствами последовательностей и функций в одном и

разных видах соответственно. В некоторых случаях присутствие гена в комбинации с определенными другими генами, наблюдаемое в виде паттерна в нескольких геномах, может указать на возможную функцию.

- Клеточные протеомы можно наблюдать двумерным гелем-электрофорезом и изучать с помощью масс-спектрометрии.
- Функцию белка в клетке иногда можно предположить, выяснив, когда и где его ген экспрессируется. ДНК-микрочипы (чипы) и белковые чипы используются для изучения экспрессии гена на клеточном уровне.
- С помощью некоторых новых методик, включая сравнительную геномику, иммунопреципитацию и дрожжевые двугибридные системы, можно регистрировать белок-белковые взаимодействия. Такие взаимодействия дают важные сведения о функции белка.

9.4. Изменения генома и новые продукты биотехнологии

Не надо заглядывать далеко в будущее, чтобы найти практические применения новых биотехнологий или увидеть перспективы новых открытий в фундаментальной науке. Геномика сама подает идеи и берется за их осуществление. Мы не только можем *понять* строение геномов, мы можем их *изменять*. Пожалуй, эта возможность является наивысшим достижением современных технологий. Мы расширим наши возможности управления организмами и получения новых фармацевтических агентов и, следовательно, улучшим питание и здоровье человека. Такие перспективы станут реальностью только в том случае, если на практике будут соблюдаться меры предосторожности во избежание безответственного применения новых технологий.

Бактериальные паразиты растений помогают клонировать растения

Введение рекомбинантной ДНК в растения имеет огромное значение для сельского хозяйства, позволяя изменять питательные характеристики и урожаи культур или их устойчивость к воз-

действиям окружающей среды, например к насекомым-вредителям, заболеваниям, к холоду, засоленности почв и засухе. Взрослые растения некоторых видов можно создать из единственной

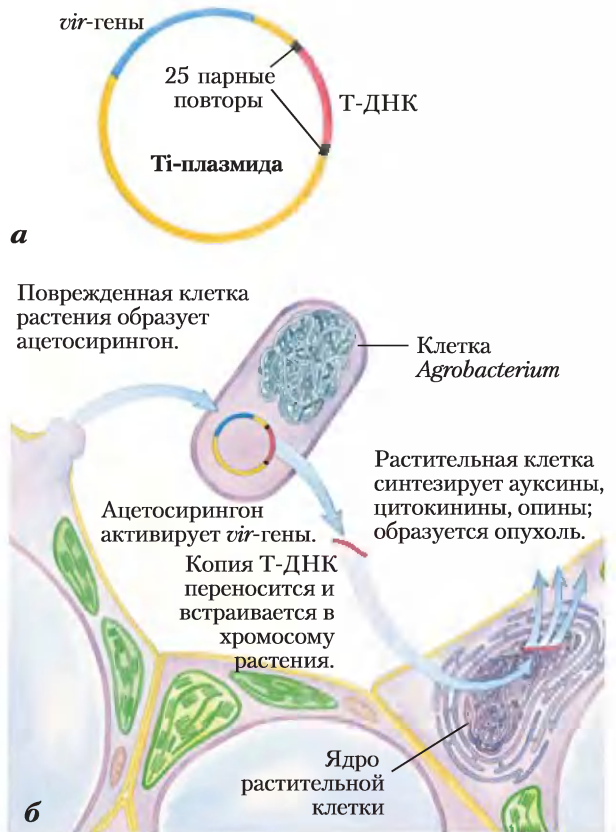


Рис. 9-26. Перенос ДНК растительным клеткам с помощью бактерии-паразита. а) Ti-плазмида (от англ. *tumor inducing*) *Agrobacterium tumefaciens*. б) Поврежденные растительные клетки образуют и высвобождают фенольное соединение ацетосирингон. При обнаружении этого соединения у р. *Agrobacterium* начинается экспрессия генов вирулентности (*vir*) Ti-плазмиды. Эти *vir*-гены кодируют ферменты, необходимые для встраивания сегмента Т-ДНК Ti-плазмиды в геном соседних растительных клеток. Образуется одноцепочечная копия Т-ДНК, которая переносится в растительную клетку, где превращается в двуцепочечную ДНК и встраивается в ее хромосому. Т-ДНК кодирует ферменты, синтезирующие как гормоны роста растения, так и опины (рис. 9-27). Последние соединения усваиваются (в качестве источника питания) только бактериями р. *Agrobacterium*. Таким образом, экспрессия генов Т-ДНК в трансформированных растительных клетках приводит как к aberrantному росту клеток растения (образование опухоли), так и к передаче бактерии питательных веществ растительной клетки.

трансформированной клетки, так чтобы введенный ген переходил к потомкам в семенах.

Ученые пока не обнаружили встречающихся в природе плазмид растительных клеток, способствующих клонированию в растениях, поэтому основная техническая проблема заключается во введении ДНК в растительные клетки. Эта проблема была решена при помощи почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens*. Эта бактерия способна поражать растения в месте повреждения, трансформировать соседние клетки и вызывать образование опухоли под названием корончатый галл. Клетка *Agrobacterium* содержит огромную (200 000 п. н.) **Тi-плазмиду** (рис. 9-26, а). При контакте бактерии с поврежденной клеткой растения 23000 п. н. сегмента Тi-плазмиды под названием Т-ДНК переносятся из плазмиды и встраиваются в произвольном месте одной из хромосом клетки растения (рис. 9-26, б). Перенос Т-ДНК из *Agrobacterium* хромосоме растительной клетки зависит от повторов длиной в 25 п. н. на концах Т-ДНК и от продуктов генов вирулентности (*vir*) в Тi-плазмиде (рис. 9-26, а).

Т-ДНК кодирует ферменты, которые преобразуют растительные метаболиты в два клас-

са соединений, выгодных бактерии (рис. 9-27). Во-первых, это гормоны роста растения (ауксины и цитокинины), стимулирующие рост трансформированных растительных клеток с образованием опухоли — корончатого галла. Во-вторых, это ряд редких аминокислот, названных опидами, которые служат в качестве источника питания для бактерии. В клетках опухоли опида образуются в больших количествах и секретируются в окружающую среду, где усвоить их может только *Agrobacterium*, используя ферменты, кодируемые в Тi-плазмиде. Таким образом, бактерия перенаправляет ресурсы растения, преобразуя их в форму, которая устраивает только ее саму.

Этот необыкновенный пример передачи ДНК из прокариотической клетки в эукариотическую — природный генно-инженерный процесс, который исследователи могут использовать для передачи рекомбинантной ДНК (вместо Т-ДНК) геному растения. В распространенной методике клонирования используют колонии бактерии р. *Agrobacterium* с двумя разными рекомбинантными плазмидами. Первая — это Тi-плазида, у которой искусственно удален

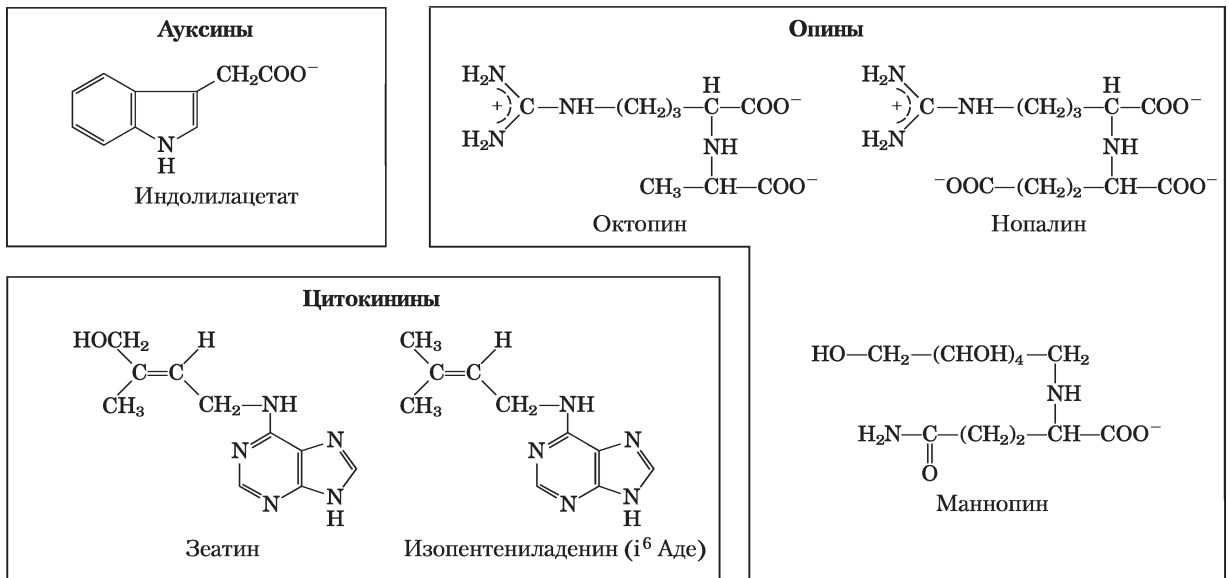


Рис. 9-27. Метаболиты, образующиеся в растительных клетках, инфицированных бактерией р. *Agrobacterium*. Ауксины и цитокинины — гормоны роста растения. Наиболее распространенный ауксин, индолилacetат, синтезируется из триптофана. Цитокинины являются производными аденина. Опины обычно образуются из предшественников аминокислот; ферментами, кодируемыми Тi-плазмидами разных видов р. *Agrobacterium*, создается, по крайней мере, 14 различных опинов.

сегмент Т-ДНК (рис. 9-28, а). Вторая — шаттл-вектор *Agrobacterium*–*E. coli*, у которого повторы Т-ДНК в 25 п. н. фланкируют чужеродный ген,



Рис. 9-28. Двухплазмидный метод создания рекомбинантных растений. а) Одна из плазмид — это модифицированная Тi-плазмид, которая содержит *vir*-гены, но не Т-ДНК. б) Другая плазмид содержит сегмент ДНК, несущий как чужеродный ген (интересующий ген, например, инсектицидного белка, изображенного на рис. 9-30), так и фактор устойчивости к антибиотику (в данном случае к канамицину), который фланкируется двумя Т-ДНК-повторами в 25 п. н., необходимыми для передачи плазмидных генов хромосоме растения. В плазмиде также присутствует локус начала репликации (*ori*), необходимый для размножения бактерии р. *Agrobacterium*.

который нужно поместить в растительную клетку, вместе с селективируемым маркером, например геном устойчивости к антибиотику канамицину (рис. 9-28, б). Сконструированная таким образом культура *Agrobacterium* используется для инфицирования листа растения, но корончатые галлы не образуются из-за того, что из обеих плазмид удалены Т-ДНК гены ферментов биосинтеза ауксинов, цитокининов и опинов. Вместо этого продукты *vir*-гена из измененной Тi-плазмиды направляют трансформацию растительных клеток чужеродным геном, который фланкируется Т-ДНК повторами в 25 п. н. во второй плазмиде. Трансформированные клетки растений можно отобрать при выращивании на чашках с агаром, содержащих канамицин, а добавление гормонов роста ускорит образование новых растений с чужеродным геном в каждой клетке.

Когда бактерия попадает в место повреждения (на разрезе листа), *vir*-гены первой плазмиды опосредуют передачу геному растения сегмента второй плазмиды, который фланкируется повторами в 25 п. н. Фрагменты листа помещают на чашку с агаром, содержащую и канамицин, и соответствующие количества гормонов роста растения; таким образом из фрагментов с трансформированными клетками формируются новые растения. Нетрансформированные клетки уничтожаются канамицином. Чужеродный ген и фактор устойчивости к антибиотику обычно передаются вместе, так что клетки растения, которые растут в такой среде, как правило, содержат интересующий ген.

Успешный перенос рекомбинантной ДНК растениям был отчетливо продемонстрирован в эксперименте по встраиванию гена люциферазы светляка в клетки табака (рис. 9-29) — наиболее удобного растения для экспериментов по трансформации, так как его клетки чрезвычайно легко трансформировать клетками *Agrobacterium*. Безусловно, возможности этой технологии не ограничиваются созданием светящихся в темноте растений. Такой же метод использовался для создания сельскохозяйственных культур, устойчивых к гербицидам, растительным вирусам и насекомым-вредителям (рис. 9-30). Возможная выгода заключается в повышении урожайности и снижении необходимости применения вредных для окружающей среды сельскохозяйственных химикатов.



Рис. 9-29. Растение табака, экспрессирующее ген люциферазы светляка. Свечение возникло после полива растения раствором люциферина, субстратом фермента люциферазы, вызывающего биолуминесценцию (см. доп. 13-1). Однако светящихся в темноте декоративных растений в наших рассадниках ожидать в скором времени не приходится. В действительности испускаемый свет довольно слаб; для получения приведенной фотографии потребовалась 24-часовая экспозиция. Однако таким образом демонстрируется истинное значение этой технологии, заключающееся в возможности передачи растениям новых свойств.



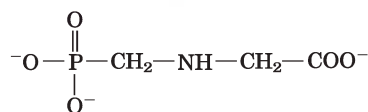
Рис. 9-30. Томаты, устойчивые к личинкам насекомых. Два растения томата подвергались воздействию одинакового числа личинок мотылька. Растение слева не было генетически измененным. В растении справа экспрессируется ген белка токсина из бактерии *Bacillus thuringiensis*. Этот белок, встроенный по схеме, приведенной на рис. 9-28, токсичен для личинок некоторых видов бабочек и безопасен для людей и других организмов. Устойчивость к насекомым была также генетически создана у хлопка и у других растений.



а



б



Глифосат

Рис. 9-31. Устойчивые к глифосату побеги сои. Два участка соевого поля в шт. Висконсин, США. **а)** Часть поля, не обработанная глифосатом, заросла сорняками. **б)** Устойчивые к глифосату соевые побеги бурно растут на обработанной этим гербицидом поле. В окружающей среде глифосат быстро распадается. Использование в сельском хозяйстве генетически модифицированных растений, подобных этим, разрешено только после тщательного рассмотрения всех «за» и «против», уравнивая исключительные перспективы новой технологии с необходимостью осмотрительного выбора новых свойств. И наука, и общество в целом заинтересованы в том, чтобы использование генетически модифицированных растений не оказало неблагоприятного воздействия на окружающую среду или здоровье человека.

Биотехнология позволяет придавать растениям новые свойства намного быстрее традиционных методов селекции. Ярким примером является разведение сои, устойчивой к распространённому гербициду глифосату (активному ингредиенту в продукте RoundUp). Глифосат быстро распадается в окружающей среде (чувствительные к глифосату растения можно сеять на обработанной территории уже через 48 ч), и его применение обычно не приводит к загрязнению грунтовых вод или к сохранению остатков до следующего года. Поля с устойчивой к глифосату соей можно один раз обработать этим гербицидом во время летнего посевного периода для уничтожения практически всех сорняков на поле, не воздействуя при этом на саму сою (рис. 9-31). Однако возможные «подводные камни» технологии, например появление устойчивых к глифосату сорняков или одичание трудноконтролируемых рекомбинантных растений, вызывают беспокойство ученых и общественности.

Манипулирование с геномами клеток животных даёт информацию о структуре хромосом и об экспрессии генов

Трансформация клеток животных чужеродным генетическим материалом предоставляет не только возможность расширения наших знаний о структуре и работе их геномов, но и важный способ выведения пород животных с новыми качествами. Такая перспектива стимулировала интенсивные исследования более совершенных методов клонирования животных.

Для большинства работ такого рода требуется источник клеток, в которые можно встроить ДНК. Несмотря на то что интактные ткани зачастую трудно сохранять и работать с ними *in vitro*, многие типы клеток животных можно выделить и вырастить в лабораторных условиях в том случае, если требования для их роста тщательно выполняются. Клетки, полученные из определенной ткани животного и выращиваемые в соответствующих для **культуры ткани** условиях, могут сохранять дифференцировку (например, гепатоциты, т. е. клетки печени, остаются гепатоцитами) в течение недель или даже месяцев.

Для введения ДНК в клетки животных не найдено подходящего вектора, подобного плазмидам, поэтому для трансформации, как пра-

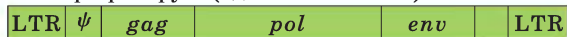
вило, требуется встраивание ДНК в хромосому клетки-хозяина. Эффективная доставка ДНК до клеточного ядра и встраивание этой ДНК в хромосому без повреждения каких бы то ни было важных генов остаются основной технической проблемой в генной инженерии клеток животных.

Разработанные методы переноса ДНК в клетку животного различаются по своей эффективности и удобству. Некоторый успех был достигнут в спонтанном введении ДНК или электропорации (эти методы отдаленно напоминают распространенные методы трансформации бактерий). Однако они неэффективны для клеток животных: трансформируется всего 1 клетка из 100–10 000. **Микроинъекция** — инъекция ДНК прямо в ядро при использовании очень тонкой иглы — обладает высокой результативностью в умелых руках, однако общее число клеток, которые можно обработать, невелико, потому что ДНК нужно вводить в каждую клетку по отдельности.

Самые эффективные и распространенные методы трансформации клеток животных основаны на липосомах или вирусных векторах. Липосомы представляют собой маленькие частицы, состоящие из липидного бислоя с заключенной внутри водой (см. рис. 11-4). Липосомы, несущие в себе молекулу рекомбинантной ДНК, можно слить с мембранами интересующих клеток, чтобы доставить ДНК внутрь. Иногда ДНК достигает ядра, где она может встроиться в хромосому (чаще всего в случайных положениях). **Вирусные векторы** еще более эффективны в доставке ДНК. У вирусов животных есть эффективные механизмы введения своих нуклеиновых кислот в клетки, а у некоторых видов также имеются механизмы встраивания своих ДНК в хромосому клетки-хозяина. Некоторые из них, например ретровирусы (см. рис. 26-33) и аденовирусы, были модифицированы для работы в качестве вирусных векторов для встраивания чужеродных ДНК в клетки млекопитающих.

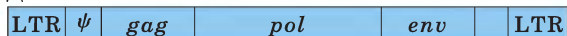
Использование ретровирусов иллюстрирует **рис. 9-32**. При попадании специально сконструированного ретровируса в клетку его РНК-геном транскрибируется в ДНК обратной транскриптазой, а затем встраивается в геном хозяина с помощью фермента вирусной интегразы. Для такой процедуры нужны особые участки ДНК: длинные повторяющиеся последовательности на

Геном ретровируса (однонитевая РНК)



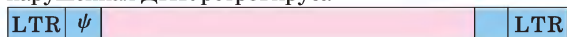
Обратная транскриптаза преобразует РНК-геном в двухнитевую ДНК.

ДНК



Вирусные гены заменяются чужеродным геном.

Рекомбинантная нарушенная ДНК ретровируса



Рекомбинантная ДНК проникает в клетки тканевой культуры.

В клетках, содержащих вспомогательный вирус, образуются РНК-копии рекомбинантных вирусов, упаковывающиеся затем в вирусных частицах.



концах (LTR-последовательности, от англ. *long terminal repeat sequences*) для встраивания ретровирусной ДНК в хромосому хозяина и ψ (пси)-последовательность для упаковки вирусной ДНК в вирусных частицах (см. рис. 26-34).

Гены *gag*, *pol* и *env* генома ретровируса, необходимые для его репликации и образования

Рис. 9-32. Использование ретровирусных векторов в клонировании клеток млекопитающих. Типичный геном ретровируса (здесь приведен в несколько упрощенном виде), сконструированный так, чтобы нести чужеродный ген (окрашен в розовый цвет), добавляется в тканевую культуру клеток-хозяев. У вспомогательного вируса (здесь не показан) отсутствует упаковочная ψ-последовательность, так что его РНК-транскрипты не могут упаковаться в вирусные частицы, но зато он предоставляет продукты генов *gag*, *pol* и *env*, необходимые для упаковки сконструированного ретровируса в функциональные вирусные частицы. Это дает возможность чужеродному гену, находящемуся в геноме рекомбинантного ретровируса, эффективно встроиться в клетки-мишени.

вирусных частиц, можно заменить чужеродной ДНК. Для образования вирусов с рекомбинантной генетической информацией необходимо ввести ДНК в культивируемые клетки, инфицированные «вспомогательным вирусом», несущим гены для образования вирусных частиц, но не имеющим ψ-последовательности, необходимой для упаковки. Таким образом удается транскрибировать ДНК и упаковывать ее РНК в вирусные частицы. Эти частицы могут действовать как векторы для введения рекомбинантной РНК в клетки-мишени. Вирусные ферменты обратная транскриптаза и интеграна (образующиеся с помощью вспомогательного вируса) тоже упаковываются в вирусную частицу и попадают в клетки-мишени. Как только специально сконструированный вирусный геном оказывается внутри клетки, эти ферменты создают ДНК-копию рекомбинантного вирусного РНК-генома и встраивают ее в хромосому хозяина. После этого встроенная рекомбинантная ДНК становится постоянной частью хромосомы клетки-мишени и реплицируется вместе с ней при каждом делении клетки. Сами по себе клетки не подвергаются опасности при встраивании вирусной ДНК, поскольку рекомбинантный вирус не содержит генов, необходимых для создания РНК-копий своего генома и упаковки их в новые вирусные частицы. Применение рекомбинантных ретровирусов зачастую является наилучшим способом введения ДНК в значительное число клеток млекопитающих.

Для вирусов каждого вида характерны свои особенности, поэтому при разработке векторов для трансформации клеток млекопитающих используют различные классы вирусов животных.



Как только биотехнология получила сильный толчок в 1980-х гг., стала весьма заманчивой идея профилактики генетических заболеваний. В принципе, в клетки человека можно ввести ДНК для корректировки наследственных генетических нарушений. Генетическую коррекцию можно даже осуществить на уровне отдельной ткани, заразив человека генетически сконструированным, тканеспецифичным вирусом, несущим в качестве полезного груза ДНК, которую нужно ввести в дефектные клетки. Такая задача выглядит чарующе, но на пути исследований полно преград.

Изменение хромосомной ДНК влечет за собой существенный риск — риск, который нельзя оценить на ранних стадиях открытия. В связи с этим первые попытки генной терапии человека были направлены всего лишь на небольшое число генетических заболеваний. Ученые и борцы за нравственность вместе разработали список из нескольких условий, которые должны быть соблюдены для оправдания сопутствующего риска. (1) Генетический дефект должен являться хорошо изученным нарушением в единственном гене. (2) И мутантный, и нормальный гены должны быть клонированы и секвенированы. (3) При отсутствии способа устранения мутантного гена функциональный ген должен хорошо работать в присутствии мутантного. (4) Наконец, что наиболее важно, серьезность заболевания должна перевешивать риски применения новой технологии. Соглашения по клиническим испытаниям на человеке были представлены учеными из нескольких стран и критически рассмотрены на предмет соответствия нормам этики и соблюдения научной строгости тщательно подобранными консультативными группами в каждой стране. Только после этого начались испытания на человеке.

С самого начала генная терапия была нацелена на раковые и генетические заболевания, оказывающие воздействие на иммунную систему. Иммунитет контролируется лейкоцитами (белыми клетками крови) нескольких типов, образующихся из недифференцированных стволовых клеток костного мозга. Эти клетки быстро делятся и обладают некоторыми метаболическими особенностями. По нескольким причинам дифференцировка может остановиться, приводя к состоянию под названием тяжелый комбинированный иммунодефицит (SCID, от англ. *severe combined immune deficiency*). Одна из форм

SCID возникает из-за наследственных генетических нарушений в гене, кодирующем аденозиндеаминазу (ADA, от англ. *adenosine deaminase*), фермент, участвующий в биосинтезе нуклеотидов (обсуждается в гл. 22). Другая форма SCID возникает из-за дефекта в белке рецептора клеточной поверхности, связывающего сигнальные молекулы цитокины, запускающие дифференцировку. В обоих случаях стволовые клетки-предшественники не могут дифференцироваться в готовые клетки иммунной системы, такие как Т- и В-лимфоциты (см. с. 249). Дети с такими редкими заболеваниями чрезвычайно восприимчивы к бактериальным и вирусным инфекциям, и очень часто страдают от ряда связанных с этим физиологических и неврологических проблем. В отсутствие эффективной терапии дети должны содержаться в стерильной обстановке. Примерно у 20% таких детей есть брат или сестра с идентичным антигеном лейкоцитов человека (HLA, от англ. *human leukocyte antigen*), который может служить донором при пересадке костного мозга. Для остальных детей нужны другие подходы.

Самая первая попытка генной терапии человека была осуществлена в Национальном институте здоровья в Бетесде, шт. Мэриленд, в 1990 г. Пациентом была четырехлетняя девочка, страдающая ADA-дефицитом. Клетки костного мозга ребенка трансформировали специально созданным ретровирусом, несущим функциональный ADA-ген; когда изменение клеток происходит таким образом — правда, в лаборатории, а не на живом пациенте, — говорят, что процедура осуществлена *ex vivo*. Обработанные клетки вводили обратно в костный мозг пациента. Через 4 года ребенок вел уже нормальную жизнь, ходил в школу и даже торжественно заявлял о своих переживаниях перед Конгрессом США. Тем не менее восстановление девочки нельзя целиком приписать генной терапии. Перед началом клинических испытаний метода генной терапии был разработан новый метод лечения недостатка ADA, в котором синтетическая аденозиндеаминаза вводилась в комплексе с полиэтиленгликолем (PEG, от англ. *polyethylene glycol*). Для многих пациентов с ADA-SCID введение комплекса ADA-PEG позволяет начать развитие иммунной системы наряду с увеличением массы тела и понижением частоты инфекционных заболеваний, хотя и не приводит к полному выздоровлению.



Успешность новой генной терапии не была очевидна, поэтому отказываться от практики введения фермента в виде комплекса с PEG при проведении генно-терапевтического испытания было неэтично. Таким образом, участники испытаний получали сразу оба метода лечения, и было непонятно, какой из них в первую очередь стоит за положительными клиническими результатами. Тем не менее клиническое испытание предоставило ценную информацию: передача генов *ex vivo* большому числу лейкоцитов осуществима, причем клетки с перенесенным геном все еще наблюдались и через несколько лет после лечения, что означает возможность долговременной коррекции. Кроме того, риск, связанный с использованием ретровирусных векторов, оценивается как невысокий.

В 1990-х гг. были выполнены сотни клинических попыток генной терапии многих генетических заболеваний человека, но в большинстве случаев результаты были обескураживающими. Выяснилось, что главным препятствием было неэффективное введение новых генов в клетки. Трансформация многих клеток просто не удавалась, а число трансформированных клеток часто оказывалось недостаточным для исправления генетического нарушения. В экспериментах с ADA было чрезвычайно трудно получить достаточную популяцию трансформированных клеток из-за ведущейся в то же время ADA-PEG-терапии. Обычно стволовые клетки с правильным ADA-геном имеют преимущество в росте над необработанными клетками, расширяя свою популяцию и постепенно преобладая в костном мозге. Однако введение комплекса ADA-PEG тем же пациентам позволяло нетрансформированным (с дефицитом ADA) клеткам жить и развиваться, а у трансформированных клеток уже не было того необходимого преимущества в росте, чтобы расширить свою популяцию за счет других.

В 2000 г. ученые-медики из Франции, Италии и Великобритании сообщили, что лечение генной терапией, начатое в 1999 г., одной из форм SCID, вызванной дефектными цитокиновыми рецепторами (в частности, субъединицей γ_c), оказалось успешным. Они ввели исправленный ген γ_c -субъединицы цитокинового рецептора в клетки CD34⁺ (стволовые клетки, из которых развиваются клетки иммунной системы, имеющие на своей поверхности белок CD34; эти клетки можно отделить от остальных клеток костного мозга антителами к CD34). Трансфор-

мированные клетки помещали обратно в костный мозг пациента; введение исправленного гена давало трансформированным клеткам явное преимущество в росте над необработанными клетками. У четырех из пяти первых пациентов иммунная система начала функционировать через 6–12 недель, а содержание зрелых Т-лимфоцитов иммунной системы достигло уровня контрольных субъектов того же возраста (у которых нет SCID) через 6–8 месяцев. Функция иммунной системы была восстановлена, и примерно через 4 года большинство детей уже вели нормальный образ жизни. Такие результаты были получены еще у четырех пациентов. Это дало весомое доказательство того, что генная терапия человека может излечить серьезное генетическое заболевание.

В начале 2003 г. пришла неудача. У двух из четырех первых пациентов, которым давали клетки с правильным геном цитокинового рецептора, развилась тяжелая форма лейкемии. На протяжении лечения генной терапией один из введенных ретровирусов сам спонтанно встроился в хромосому одной клетки CD34⁺, приведя к необычайно высокой экспрессии гена LMO-2. Пораженная клетка дифференцировалась в Т-клетку иммунной системы, а повышенная экспрессия гена LMO-2 привела к неконтролируемому делению клетки, вызвав лейкемию. У обоих пациентов была хорошая реакция на химиотерапию, у остальных проблема не возникла. Однако инцидент подтвердил, что первоначальные беспокойства по поводу риска, связанного с использованием ретровирусных векторов, действительно имели под собой основу. После просмотра протоколов клинических испытаний генной терапии и консультаций с борцами за нравственность и родителями больных детей в дальнейшем все же планируется продолжить лечение детей, для которых не предполагается пересадка костного мозга. Причина довольно проста. Было признано, что потенциальная польза детям в таком ослабленном состоянии преобладает над выявленным риском. По-видимому, развитие новых вирусных векторов является наиболее важным условием для успешного развития генной терапии.

Генная терапия человека не ограничивается наследственными заболеваниями. В раковые клетки можно ввести гены белков, которые способны уничтожить клетку или восстановить нормальную регуляцию клеточного деления. Клетки иммунной системы, связанные с опухолями и называемые противо-

опухолевыми эффекторными лимфоцитами, можно генетически модифицировать для образования фактора некроза опухоли (TNF, от англ. *tumor necrosis factor*, см. рис. 12-51). Если такие лимфоциты взять у ракового больного, модифицировать и вернуть обратно, рекомбинантные клетки обнаружат опухоль, а образуемый ими TNF вызовет сокращение опухоли. СПИД тоже можно лечить генной терапией. ДНК, которая кодирует молекулу РНК, комплементарную мРНК жизнеспособного вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), можно поместить в клетки иммунной системы (мишени ВИЧ). РНК, которая транскрибируется из встроенной ДНК, должна комплементарно связаться с мРНК ВИЧ, предотвращая его трансляцию и препятствуя жизненному циклу вируса. Еще

можно встроить ген, кодирующий неактивную форму одной субъединицы мультидоменного фермента ВИЧ; с одной нефункциональной субъединицей весь фермент может стать неактивным.

Растущее понимание генома человека и генетической основы некоторых заболеваний дает надежду на раннюю диагностику и конструктивное вмешательство. Однако, если судить по первым результатам, то путь к эффективной терапии обещает быть долгим с многочисленными препятствиями. Необходимо узнать больше о клеточном метаболизме, о взаимодействии генов и о том, как справляться с рисками. Перспектива победы над опасными для жизни генетическими нарушениями и другими угрожающими заболеваниями дает повод продолжать активную работу.

Например, у аденовирусов нет механизма встраивания ДНК в хромосому. Поэтому рекомбинантная ДНК, доставленная с помощью аденовирусного вектора, экспрессируется всего лишь непродолжительное время, а затем разрушается. Но это может быть полезным, если требуется кратковременная экспрессия гена.

У животных трансформация клеток любым из обсуждаемых выше способов сопряжена со своими проблемами. Внедренная в клетку ДНК, как правило, встраивается в хромосому в произвольном месте. Даже если у чужеродной ДНК будет такая же последовательность, как и у хромосомы хозяина, позволяющая «прицелиться» к этому месту, негомологичные компоненты по величине все же на несколько порядков больше «мишени». Если такие встраивания затронут важнейшие гены, то это иногда приводит к изменению функций клетки (тем не менее большинство клеток диплоидные или полиплоидные, поэтому при встраивании по крайней мере одна копия любого данного гена остается нетронутой). Чрезвычайно скверным результатом такого встраивания могла бы стать непреднамеренная активация гена, стимулирующего клеточное деление, что, вероятно, привело бы к образованию раковых клеток. Хотя когда-то и считалось, что такое событие маловероятно, недавние исследования подтвердили его опасность (доп. 9-2). Наконец, место встраивания может определять уровень экспрессии встроен-


ного гена, поскольку интегрированные компоненты не транскрибируются одинаковым образом по всему геному.

Несмотря на все эти проблемы, трансформация клеток животных широко использовалась для изучения структуры и функции хромосом, регуляции и экспрессии генов. Удачную передачу рекомбинантной ДНК животному можно проиллюстрировать на примере эксперимента, в котором перманентно менялась легко наблюдаемая физическая особенность, передаваемая по наследству. Микроинъекция ДНК в ядро оплодотворенной яйцеклетки мыши приводит к эффективной трансформации (хромосомному встраиванию). Если такие яйцеклетки ввести самке мыши и позволить им развиваться, то у некоторых из новорожденных мышей зачастую экспрессируется новый ген. Тех, у которых изменилась эмбриональная линия, можно обнаружить, анализируя *их потомство*. Аккуратным разведением таких мышей можно положить начало новой линии **трансгенных** мышей, в которой все особи гомозиготны по новому гену или генам. На сегодняшний день получают трансгенных мышей с большим диапазоном генетических вариаций, многие из которых связаны с человеческими заболеваниями и их контролем, намечая путь к генной терапии человека (доп. 9-2). Похожий подход используется для создания мышей, у которых определенный ген инактиви-

Технология рекомбинантных ДНК дает результаты и открывает новые перспективы

Продукты технологий рекомбинантных ДНК простираются от белков до «сконструированных» организмов. С помощью этих технологий можно создавать огромное число коммерческих белков, разрабатывать микроорганизмы для особых задач и создавать растения и животных с полезными свойствами для применения в сельском хозяйстве или медицине. Некоторые продукты этих технологий были одобрены для потребительского или профессионального использования, многие еще находятся в стадии разработки. Генная инженерия всего за несколько лет преобразовалась из многообещающей новой технологии в многомиллиардную индустрию, а наибольший рост произошел в фармацевтической промышленности. В табл. 9-4 приведены

несколько основных классов новых продуктов технологии рекомбинантных ДНК.

 Новейший продукт технологии рекомбинантной ДНК — эритропоэтин. Этот белковый гормон ($M_r = 51000$) стимулирует образование эритроцитов. Люди с заболеваниями, влияющими на работу почек, нередко испытывают недостаток этого белка, что приводит к анемии. Эритропоэтин, полученный по технологии рекомбинантной ДНК, может быть использован для лечения таких пациентов; тем самым снижается необходимость повторных переливаний крови. ■

Не перестают появляться другие приложения этой технологии. Ферменты, созданные на основе технологии рекомбинантных ДНК, уже используют в производстве моющих средств, сахара и сыра. Модифицированные белки используют в качестве пищевых добавок для придания питательных свойств, вкуса и запаха. Разрабатываются микроорганизмы с измененными или со-

Таблица 9-4  Некоторые продукты технологии рекомбинантных ДНК для медицины

Категория продукта	Примеры/применения
Антикоагулянты	Тканевой активатор плазминогена (ТРА, от англ. <i>tissue plasminogen activator</i>); активирует плазмин, фермент, задействованный в растворении тромбов; эффективен при лечении сердечных приступов
Факторы свертывания крови	Фактор VIII; способствует свертыванию крови; его не хватает больным гемофилией; введение фактора VIII, полученного с помощью технологии рекомбинантной ДНК, снижает риск заражения при переливании крови
Колонистимулирующие факторы	Факторы роста иммунной системы, стимулирующие образование лейкоцитов; лечение иммунодефицитов и заражений
Эритропоэтин	Стимулирует образование эритроцитов; лечение анемии при заболевании почек
Факторы роста	Стимулируют дифференцировку и рост клеток разных видов; способствуют заживлению ран
Гормон роста человека	Лечение карликовости
Инсулин человека	Лечение диабета
Интерфероны	Препятствуют размножению вирусов; используются для лечения некоторых видов рака
Интерлейкины	Активируют и стимулируют лейкоциты различных классов; можно использовать при лечении ранений, ВИЧ-инфекций, рака и иммунодефицитов
Моноклональные антитела	Исключительная специфичность связывания используется в диагностических тестах, для направленного транспорта лекарств, токсинов или радиоактивных соединений к опухолям при терапии рака; есть и много других применений
Супероксиддисмутаза	Предотвращает повреждение ткани активными формами кислорода, когда в ней, лишенной ненадолго O_2 во время хирургического вмешательства, внезапно восстанавливается кровоток
Вакцины	Белки из оболочек вирусов более безопасны и также эффективны в «натаскивании» иммунной системы, как и мертвые вирусы, традиционно наиболее применяемые в качестве вакцин; самой первой была разработана вакцина от гепатита В

вершенно новыми метаболическими путями для добычи нефти и минералов из подземных месторождений, для ликвидации разливов нефти и детоксикации опасных мусорных свалок и сточных вод. Модифицированные растения с повышенной устойчивостью к засухе, морозу, насекомым-вредителям и заболеваниям повышают урожайность и снижают необходимость использования в сельском хозяйстве химикатов. Можно полностью клонировать животных, перенося целое ядро со всем его генетическим материалом в специально подготовленную яйцеклетку, из которой ее собственное ядро было удалено.

О необычайных перспективах современной биотехнологии идут постоянные дискуссии. Клонирование млекопитающих затрагивает нормы общественной морали и может сопровождаться серьезными проблемами со здоровьем и продолжительностью жизни клонированных животных. Если можно создавать полезные лекарственные вещества, то созданные токсины могут стать биологическим оружием. Потенциальные опасности, связанные с попаданием модифицированных растений и других организмов в биосферу, продолжают тщательно отслеживаться. Весь спектр долговременных последствий этой технологии для человека как биологического вида и всей природной среды невозможно предвидеть без более глубокого изучения клеточного метаболизма и экологических аспектов.

Краткое содержание раздела 9.4 ИЗМЕНЕНИЯ ГЕНОМА И НОВЫЕ ПРОДУКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

- Успехи в секвенировании целого генома и в методах геномной инженерии расширяют возможности модификации геномов у всех биологических видов.
- Клонирование в растениях, при котором используется плазмидный вектор из бактерии р. *Agrobacterium*, позволяет придавать растениям новые свойства.
- При клонировании животных ученые вводят чужеродную ДНК преимущественно с помощью вирусных векторов или микроинъекций. На основе этих методов можно создавать трансгенных животных и получить новые способы геномной терапии человека.

- Использование геномики и протеомики в фундаментальных и фармацевтических исследованиях сильно продвигает создание новых лекарств. Кроме того, с помощью биотехнологии создается все расширяющийся спектр иных продуктов и технологий.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

Ti-плазида 470	Ортологи 462
Библиотека кДНК 451	Плазида 439
Вектор 434	Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 452
Геномика 434	Полиморфизм последовательностей 454
Геномная библиотека 449	Полиморфизмы длины фрагментов рестрикции (RFLP) 455
ДНК-лигаза 434	Протеом 461
ДНК-маркирующий сайт (STS) 450	Протеомика 461
ДНК-микрочип 463	Рекомбинантная ДНК 434
Искусственная бактериальная хромосома (BAC) 442	Сайт-специфичный мутагенез 446
Искусственная хромосома дрожжей (YAC) 442	Саузерн-блоттинг 455
Клонирование 434	Синтения 462
Комплементарная ДНК (кДНК) 451	Системная биология 462
Контиг 449	Слитый белок 447
Короткие тандемные повторы (STR) 455	Снятие ДНК-отпечатка 454
Метка экспрессируемой последовательности (EST) 451	Трансгенный 477
Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) 460	Тэг 447
	Тэг His 447
	Эндонуклеазы рестрикции 434
	Эпитопная метка 451

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая литература

Jackson, D.A., Symons, R.H., & Berg, P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 2904–2909.

Описание первого эксперимента с рекомбинантной ДНК, в котором происходило связывание ДНК от двух видов.

Lobban, P.E. & Kaiser, A.D. (1973) Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **78**, 453–471.

Сообщение о первом эксперименте с рекомбинантной ДНК.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Хотя уже и есть более новые руководства, в этом трехтомнике содержится много полезной вводной информации о биологических, химических и физических принципах, лежащих в основе как классических, так и современных методов.

Клонирование генов

Arnheim, N. & Erlich, H. (1992) Polymerase chain reaction strategy. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 131–156.

Giepmans, B.N.G., Adams, S.R., Ellisman, M.H., & Tsien, R.Y. (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217–224.

Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H.N., Kuch, M., & Paabo, S. (2001) Ancient DNA. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 353–359.

Успехи и неудачи в восстановлении ДНК из образцов очень большого возраста.

Ivanov, P.L., Wadhams, M.J., Roby, R.K., Holland, M.M., Weedn, V.W., & Parsons, T.J. (1996) Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. *Nat. Genet.* **12**, 417–420.

Lindahl, T. (1997) Facts and artifacts of ancient DNA. *Cell* **90**, 1–3.

Хорошее описание того, как химия нуклеиновых кислот влияет на использование ДНК в археологии.

Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems *App. Microbiol. Biotech.* **72**, 211–222

Геномика

Bamshad, M. & Wooding, S.P. (2003) Signatures of natural selection in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 99A–111A.

Использование генома человека, чтобы проследить его эволюцию.

Budowle, B., Johnson, M.D., Fraser, C.M., Leighton, T.J., Murch, R.S., & Chakraborty, R. (2005) Genetic analysis and attribution of microbial forensics evidence. *Crit. Rev. Microbiol.* **31**, 233–254.

Как биотехнология используется для борьбы с биотерроризмом.

Carroll, S.B. (2003) Genetics and the making of *Homo sapiens*. *Nature* **422**, 849–857.

Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. (2005) Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* **427**, 69–87.

Collins, F.S., Green, E.D., Guttmacher, A.E., & Guyer, M.S. (2003) A vision for the future of genomics research. *Nature* **422**, 835–847.

Dennis, C. (2005) Branching out. *Nature* **437**, 17–19.

Как мы можем узнать больше о себе, секвенируя геном приматов.

Hill, R.S. & Walsh, C.A. (2005) Molecular insights into human brain evolution. *Nature* **437**, 64–66.

Как можно использовать геномику для углубленного изучения эволюции человека.

International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931–945.

Koonin, E.V. (2005) Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 309–338.

Хорошее описание основ сравнительной геномики.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.

Обсуждение предварительных результатов изучения последовательности генома человека, собранных воедино в международном проекте «Геном человека». В этом номере много и других полезных статей.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304–1351.

Описание предварительного плана последовательности генома человека, предложенного Celera Corporation. Многие другие статьи в этом же выпуске способствуют пониманию и предоставляют дополнительную информацию.

Протеомика

Pandey, A. & Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837–846.

Исключительно хорошее описание различных подходов и методов определения белков и их функций.

Stoughton, R.B. (2005) Applications of DNA microarrays in biology. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 53–82.

Zhu, H., Bilgin, M., & Snyder, M. (2003) Proteomics. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 783–812.

Использование биотехнологии

Foster, E.A., Jobling, M.A., Taylor, P.G., Donnelly, P., de Knijff, P., Mieremet, R., Zerjal, T., & Tyler-Smith, C. (1999) The Thomas Jefferson paternity case. *Nature* **397**, 32.

Последняя статья из серии о расследовании интересного дела, в которой демонстрируется использование биотехнологии для ответа на исторические вопросы.

Hansen, G. & Wright M.S. (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* **4**, 226–231.

Lapham, E.V., Kozma, C., & Weiss, J. (1996) Genetic discrimination: perspectives of consumers. *Science* **274**, 621–624.

«Плюсы» и «минусы» знания о своем геноме.

Mahowald, M.B., Verp, M.S., & Anderson, R.R. (1998) Genetic counseling: clinical and ethical challenges. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 547–559.

Ohlstein, E.H., Ruffolo, R.R., Jr., & Elliott, J.D. (2000) Drug discovery in the next millennium. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 177–191.

Thompson, J. & Donkersloot, J.A. (1992) N-(Carboxyalkyl) amino acids: occurrence, synthesis, and functions. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 517–557.

Основные сведения о структуре и биологических функциях опинов.

Verma, I.M. & Weitzman, M.D. (2005) Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 711–738.

Хорошее описание перспектив и актуальных ограничений технологии.

Вопросы и задачи

1. Клонирование. При соединении двух или более фрагментов ДНК ученые могут подбирать последовательность в месте слияния множеством хитроумных способов, рассматриваемых в следующих упражнениях.

а) Изобразите структуру каждого конца линейного фрагмента ДНК, образуемого при рестрикции ферментом *EcoRI* (включая последовательности, остающиеся от сайта узнавания *EcoRI*).

б) Изобразите структуру, получающуюся в результате реакции этой концевой последовательности с ДНК-полимеразой I и четырьмя дезоксирибонуклеотидтрифосфатами (см. рис. 8-33).

в) Приведите последовательность, получающуюся в месте стыковки двух концов с полученной в (б) структурой при их сшивке (см. рис. 25-17).

г) Изобразите результат воздействия на структуру (а) нуклеазой, разрушающей только одноцепочечную ДНК.

д) Приведите последовательность на стыке при сшивке конца со структурой (б) с концом со структурой (г).

е) Изобразите структуру конца линейного фрагмента ДНК, образованного при рестрикции ферментом *PvuII* (рассмотрите последовательности, остающиеся от последовательности распознавания *PvuII*).

ж) Приведите последовательность на стыке при сшивке конца со структурой (б) с концом со структурой (е).

з) «Синтезируйте» короткий фрагмент двухцепочечной ДНК с любой последовательностью

на ваше усмотрение. На основе этого синтетического фрагмента и методов из пунктов от (а) до (ж) разработайте схему удаления из молекулы ДНК сайта рестрикции *EcoRI* и встраивания нового сайта рестрикции *BamHI* примерно в том же месте (см. рис. 9-3).

и) Предложите четыре различных коротких синтетических фрагмента двухнитевой ДНК, которые позволили бышить структуру (а) с фрагментом ДНК, образованным при рестрикции ферментом *PstI*. Водномизэтихфрагментов сконструируйте последовательность, так чтобы в конечном соединении были последовательности распознавания как *EcoRI*, так и *PstI*. Во втором и третьем фрагментах сконструируйте последовательности так, чтобы соединение содержало последовательность распознавания либо *EcoRI*, либо *PstI* соответственно. В четвертом фрагменте разработайте последовательность без сайтов рестрикции *EcoRI* и *PstI*.

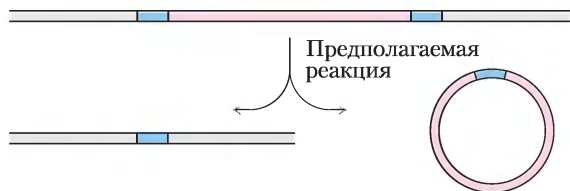
2. Отбор рекомбинантных плазмид. При клонировании фрагмента чужеродной ДНК в плазмиде часто бывает полезно вставлять фрагмент на участке, нарушающем целостность селективного маркера (например, ген устойчивости к тетрациклину плазмиды pBR322). Потерю своей функции нарушенным геном можно использовать для обнаружения клонов, содержащих рекомбинантные плазмиды с чужеродной ДНК. В случае вектора на основе бактериофага λ в этом нет необходимости, поскольку можно легко отличить векторы с огромными фрагментами чужеродной ДНК от тех, у которых их нет. Как такие рекомбинантные векторы идентифицируют?

3. Клонирование ДНК. Плазмидный клонирующий вектор pBR322 (см. рис. 9-4) разрезается эндонуклеазой рестрикции *PstI*. Взятый из эукариотического генома фрагмент ДНК (также полученный разрезанием с помощью *PstI*) вставляется в приготовленный вектор и сшивается. Раствор сшитых таким образом ДНК затем используется для трансформации бактерий, а бактерии с плазмидами отбираются выращиванием в присутствии тетрациклина.

а) Какие еще типы плазмид кроме искомой рекомбинантной плазмиды можно обнаружить среди трансформированных бактерий, устойчивых к тетрациклину? Как их можно различить?

б) Фрагмент клонируемой ДНК имеет длину 1000 п. н., а сайт *EcoRI* расположен на расстоянии

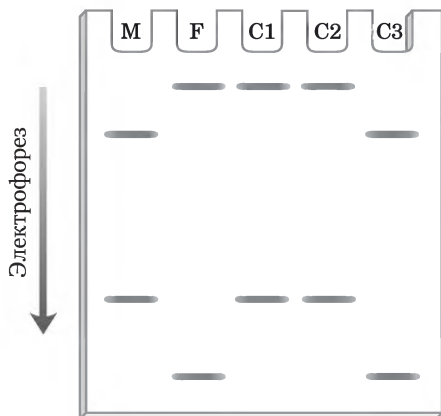
ем клеток. Предполагается, что ДНК удаляется в процессе сайт-специфичной рекомбинации, при которой участки на концах сегмента слипаются, а удаленная ДНК появляется в виде кольцевой молекулы в качестве продукта реакции.



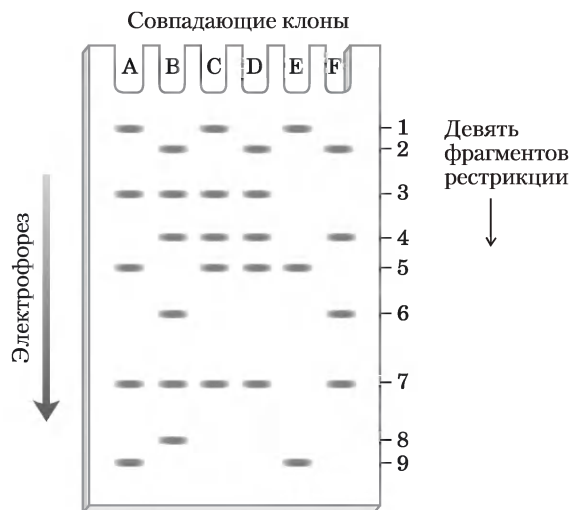
Подумайте, как можно использовать полимеразную цепную реакцию (ПЦР) для обнаружения кольцевой формы удаленной ДНК в экстракте одноклеточных организмов.

7. Светящиеся растения. Выращенные на обычной садовой почве в условиях нормального полива растения, несущие ген зеленого флуоресцентного белка (см. рис. 9-15, а), светятся в темноте, а растения, несущие ген люциферазы светляка (см. рис. 9-29), не светятся. Как можно это объяснить?

8. Использование RFLP-анализа для теста на отцовство. Получение отпечатков ДНК и RFLP-анализ очень часто используют при тесте на отцовство. Ребенок наследует хромосомы как от матери, так и от отца, поэтому в ДНК ребенка обнаруживаются отдельные рестрикционные фрагменты генетического материала, взятые у каждого из родителей. На основе данных электрофореза, приведенных здесь, скажите, какой ребенок, если таковой имеется, не является биологическим потомком предполагаемого отца? Обоснуйте свой вывод. Дорожка М соответствует пробе, взятой у матери, F — у предполагаемого отца, а C₁, C₂ и C₃ — у детей.



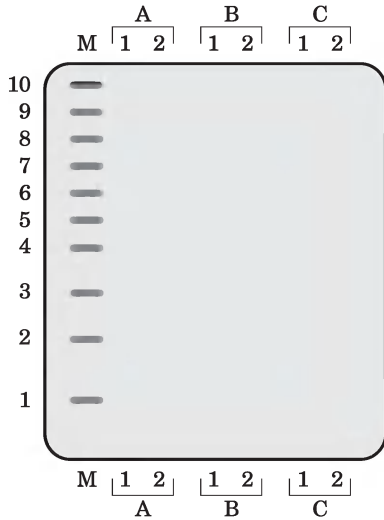
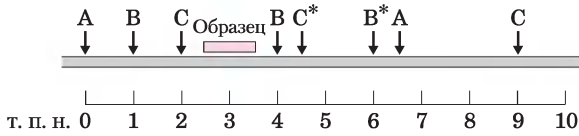
9. Картирование хромосомного сегмента. Группа перекрывающихся клонов, обозначенных буквами от А до F, получена из одного и того же участка хромосомы. Каждый из клонов по отдельности разрезается рестриктазой, а фрагменты разделяются электрофорезом в агарозном геле, как это показано на рисунке снизу. Из этого участка хромосомы рестрикцией получено девять различных фрагментов, причем в каждом клоне есть их определенное подмножество. На основе этой информации определите порядок следования рестрикционных фрагментов в хромосоме.



10. Клонирование в растениях. В методике, схематично изображенной на рис. 9-28, используются клетки бактерии р. *Agrobacterium*, содержащие две отдельные плазмиды. Подумайте, почему последовательности двух плазмид не объединяются в одну.

11. Получение отпечатков ДНК и RFLP-анализ. Из клеток крови двух людей (1 и 2) берут ДНК. В отдельных экспериментах ДНК каждого из них разрезают эндонуклеазами рестрикции А, В и С, а фрагменты разделяют электрофорезом. На рисунке изображена гипотетическая карта сегмента хромосомы человека длиной 10 000 п. н. У 2-го человека есть точечные мутации, устраняющие рестрикционные сайты распознавания В* и С*. Вы метите гели радиоактивным олигонуклеотидом, комплементарным указанной последовательности, и подносите к гелю рентге-

новскую пленку. Укажите, где бы на пленке вы ожидали увидеть полосы. Дорожки в геле размечены на диаграмме.



12. Использование фотолитографии в приготовлении ДНК-микрочипов. На рис. 9-21 показаны начальные стадии работы при изготовлении ДНК-микрочипа или ДНК-чипа с использованием фотолитографии. Опишите остальные этапы, необходимые для получения требуемых последовательностей (разная четырехнуклеотидная последовательность в каждой из четырех ячеек), изображенных в рамке. После каждого шага покажите получившуюся нуклеотидную последовательность в каждой ячейке.

13. Клонирование в млекопитающих. Ретровирусные векторы, приведенные на рис. 9-32, позволяют осуществить эффективную интеграцию чужеродной ДНК в геном млекопитающего. Объясните, как эти векторы, у которых нет генов репликации и упаковки вируса (*gag*, *pol*, *env*), помещаются в инфицирующие вирусные частицы. Подумайте, почему так важно, чтобы у этих векторов не было генов репликации и упаковки.

Анализ экспериментальных данных

14. HincII: Первая эндонуклеаза рестрикции. Об открытии эндонуклеазы рестрикции, которую можно было использовать на практике, впервые сообщалось в двух статьях, опубликованных в 1970 г. В первой работе Смит и Уилкокк описали выделение фермента, который расщеплял двуцепную ДНК. Нуклеазную активность фермента измеряли по снижению вязкости раствора ДНК при его обработке ферментом.

а) Почему вязкость раствора ДНК уменьшается после обработки ферментом?

Для того чтобы понять, является ли фермент эндо- или экзонуклеазой, им обрабатывали ДНК, меченную ³²P, а затем добавляли трихлоруксусную кислоту (ТХУ). В таких условиях единичные нуклеотиды должны были оставаться в растворе, а олигонуклеотиды выпадать в осадок.

б) При обработке ферментом меченой ДНК не образовывалось фрагментов, растворимых в ТХУ. На основании этого результата установите, являлся ли фермент эндо- или экзонуклеазой. Объясните свои суждения.

При расщеплении полинуклеотидной цепи фосфатная группа обычно не отщепляется, а остается связанной с 5'- или 3'-концом образующегося фрагмента ДНК. Смит и Уилкокк предложили следующий протокол для определения положения фосфатной группы.

1. Обработка немеченой ДНК-нуклеазой.
2. Добавление к аликвоте продукта, полученного на стадии 1, меченного радиоактивной меткой АТР (γ -[³²P]АТР), и полинуклеотидкиназы (фермент, который присоединяет γ -фосфат АТР к 5'-гидроксильной группе, но не к 5'-фосфатной, 3'-гидроксильной или 3'-фосфатной группе). Измерение количества ³²P, включенного в ДНК (образец А).
3. Добавление к продукту, полученному на стадии 1, щелочной фосфатазы (фермент, удаляющий фосфатные группы с 5'- и 3'-концов), а затем полинуклеотидкиназы и γ -[³²P]АТР. Измерение количества ³²P, включенного в ДНК (образец В).

в) В образце А скорость счета составила 136 имп./мин, а в образце В — 3740 имп./мин. Зная это, ответьте, оставалась ли фосфатная группа на 5'- или на 3'-конце фрагмента ДНК после обработки ферментом? Объясните свой ответ.

г) При обработке ДНК бактериофага Т7 нуклеазой появлялось около 40 фрагментов ДНК различной длины. Каким образом этот факт свидетельствует в пользу того, что фермент рестрикции узнает специфические участки ДНК, а не вносит в двойную спираль случайные разрывы?

На данном этапе исследования существовало две гипотезы: 1) фермент вносит разрывы внутри узнаваемого им участка; 2) фермент узнает определенную последовательность, но расщепляет ДНК где-то на соседнем участке. Чтобы разрешить эту проблему, Келли и Смит определяли 5'-концевые последовательности фрагментов ДНК, образующихся при расщеплении нуклеазой. Для этого был предложен следующий протокол.

1. Обработка ДНК фага Т7 ферментом рестрикции.
2. Обработка образующихся фрагментов щелочной фосфатазой для удаления 5'-фосфатных групп.
3. Обработка полученных на стадии 2 фрагментов полинуклеотидкиназой в присутствии γ -[³²P]АТР для введения метки в 5'-концы фрагментов ДНК.

4. Обработка меченых фрагментов ДНКазми с целью превращения фрагментов ДНК в смесь моно-, ди- и тринуклеотидов.
5. Определение последовательности меченых моно-, ди- и тринуклеотидов путем их сравнения с олигонуклеотидами с известной последовательностью с помощью метода тонкослойной хроматографии.

Среди меченых продуктов были обнаружены следующие: мононуклеотиды А и Г, динуклеотиды 5'-рАрА-3' и 5'-рГрА-3', тринуклеотиды 5'-рАрАрС-3' и 5'-рГрАрС-3'.

д) Какая гипотеза о способе расщепления последовательности ДНК нуклеазой согласуется с полученными результатами? Объясните свои рассуждения.

Келли и Смит занялись определением 3'-концевых последовательностей фрагментов, образующихся при расщеплении ДНК нуклеазой. Они обнаружили смесь 5'-рТрС-3' и 5'-рТрТ-3'. Им не удалось определить последовательности ни одного тринуклеотида на 3'-конце фрагментов.

е) На основании этих данных определите последовательность, узнаваемую нуклеазой, и укажите точное место расщепления цепи ДНК внутри этого фрагмента. Ответ оформите в виде табл. 9-2.

Литература

Kelly, T.J. & Smith, H.O. (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: II. Base sequence of the recognition site. *J. Mol. Biol.* **51**, 393–409.

Smith, H.O. & Wilcox, K.W. (1970) A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*: I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.* **51**, 379–391.

Жир, отделенный от солеобразующих оснований, был растворен в кипящем спирте. После охлаждения раствора были получены очень чистые кристаллы, которые были подвергнуты изучению. Это вещество еще не было описано, ... , и я предложил назвать его маргарином (от греч. жемчуг) из-за внешнего сходства с перламутром; в его состав входят солеобразующие основания в самых разных комбинациях.

Мишель-Эжен Шеврель. Philosophical Magazine, 1814

Липиды

- 10.1. Запасные липиды 487
- 10.2. Структурные липиды в мембранах 496
- 10.3. Липиды как сигнальные вещества, кофакторы и пигменты 506
- 10.4. Методы анализа липидов 515

Биологические липиды представляют собой химически разнородную группу соединений, общим и определяющим свойством которых является нерастворимость в воде. Биологические функции липидов столь же разнообразны, как и их химический состав. Жиры и масла относятся к главным запасаемым формам энергии во многих организмах. Фосфолипиды и стеринны — основные структурные элементы биологических мембран. Другие липиды, хотя и присутствуют в относительно малых количествах, играют ключевые роли в качестве кофакторов ферментов, переносчиков электронов, светопоглощающих пигментов, гидрофобных якорей для белков, «шаперонов», способствующих укладке (фолдингу) мембранных белков, эмульгаторов в пищеварительном тракте, гормонов и внутриклеточных мессенджеров. Эта глава познакомит нас с представителями липидов каждого типа, уделив особое внимание их химической структуре и физическим свойствам. Порядок изложения материала в данной главе отражает функциональную организацию липидов, однако следует сказать, что существует и другой способ классификации, в соответствии с которым около тысячи известных липидов распределяются по восьми катего-

риям в соответствии с химической структурой и другими критериями (см. табл. 10-3). Окисление липидов — процесс, поставляющий энергию, мы обсудим в гл. 17, а их синтез — в гл. 21.

10.1. Запасные липиды

Жиры и масла, используемые почти универсально в качестве резервуаров энергии в живых организмах, являются производными **жирных кислот**. Жирные кислоты — производные углеводов, находящиеся в таком же низкоокисленном (т. е. высоковосстановленном) состоянии, как и углеводороды нефтяных и газовых месторождений. Клеточное окисление жирных кислот (до CO_2 и H_2O), подобно контролируемому сгоранию бензина в двигателе внутреннего сгорания, высокоэкзергонично.

Ниже мы обсудим строение и номенклатуру жирных кислот, наиболее часто встречающихся в живых организмах. Чтобы проиллюстрировать разнообразие структуры и физических свойств в этом классе соединений, будут описаны два типа содержащих жирные кислоты веществ — триглицериды и воски.

Жирные кислоты — производные углеводов

Жирные кислоты — это карбоновые кислоты с углеводородными цепями длиной от 4 до 36 углеродных атомов ($\text{C}_4\text{—C}_{36}$). У некоторых жирных кислот углеродная цепь неразветвленная и полно-

Таблица 10-1 Некоторые природные жирные кислоты: строение, свойства и номенклатура

Углеродный скелет	Структурная формула *	Систематическое название **	Тривиальное название (происхождение)	Температура плавления (°C)	Растворимость при 30 °C (мг/г растворителя)	
					Вода	Бензол
12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	<i>n</i> -Додекановая кислота	Лауриновая кислота (от лат. <i>Laurus</i> — лавр)	44,2	0,063	2600
14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	<i>n</i> -Тетрадекановая кислота	Миристиновая кислота (от лат. <i>Myristica</i> , вид мускатного ореха)	53,9	0,024	874
16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	<i>n</i> -Гексадекановая кислота	Пальмитиновая кислота (от лат. <i>palma</i> — пальма)	63,1	0,0083	348
18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	<i>n</i> -Октадекановая кислота	Стеариновая кислота (от греч. <i>stear</i> — тяжелый жир)	69,6	0,0034	124
20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	<i>n</i> -Эйкозановая кислота	Арахидиновая кислота (от лат. <i>Arachis</i> , вид бобов)	76,5		
24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	<i>n</i> -Тетракозановая кислота	Лигноцериновая кислота (от лат. <i>lignum</i> — дерево + <i>cera</i> — воск)	86,0		
16:1 (Δ^9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>цис</i> -9-Гексадеценая кислота	Пальмитолеиновая кислота	1–0,5		
18:1 (Δ^9)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>цис</i> -9-Октадеценая кислота	Олеиновая кислота (от лат. <i>oleum</i> — масло)	13,4		
18:1 ($\Delta^{9,12}$)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>цис</i> -, <i>цис</i> -9,12-Октадекадиеновая кислота	Линолевая кислота (от греч. <i>linon</i> — лен)	1–5		
18:3 ($\Delta^{9,12,15}$)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	<i>цис</i> -, <i>цис</i> -, <i>цис</i> -9,12,15-Октадекатриеновая кислота	α -Линоленовая кислота	–11		
20:4 ($\Delta^{5,8,11,14}$)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	<i>цис</i> -, <i>цис</i> -, <i>цис</i> -, <i>цис</i> -5,8,11,14-Эйкозатетраеновая кислота	Арахидоновая кислота	–49,5		

* Все кислоты представлены в неионизованной форме. При pH 7 карбоксильная группа всех жирных кислот ионизована. Заметим, что нумерация углеродных атомов начинается с карбоксильного углерода.

** «*n*» обозначает нормальную неразветвленную структуру. Например, «додекановая» просто указывает на 12 углеродных атомов, которые могут давать разные разветвленные формы; «*n*-додекановая» обозначает линейную, неразветвленную форму. Для ненасыщенных жирных кислот указывается конфигурация при двойной связи; биологические жирные кислоты почти всегда имеют *цис*-конфигурацию.

стью насыщенная (не содержит двойных связей); у других молекула содержит одну или более двойных связей (табл. 10-1). В состав некоторых соединений входят трехуглеродные циклы, гидроксильные группы или боковые метильные группы.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Упрощенная номенклатура этих соединений основана на длине цепи и числе двойных связей; соответствующие числа разделяют двоеточием (**рис. 10-1, а**); например, содержащая 16 углеродных атомов насыщенная



Рис. 10-1. Две номенклатуры жирных кислот. а) Согласно стандартной номенклатуре, номером один обозначают атом углерода карбоксильной группы (С-1). Положение каждой двойной связи указывают с помощью буквы дельта (Δ) с надстрочным индексом, соответствующим атому углерода при двойной связи, который имеет наименьший номер. б) Для полиненасыщенных кислот используется другая система обозначений, и атомы углерода нумеруют в обратном порядке. Номер один — атом углерода метильной группы на конце цепи; этот атом углерода также обозначают буквой «омега» (ω , последняя буква греческого алфавита). Положение двойных связей указывают по отношению к ω -углероду.

пальмитиновая кислота сокращенно обозначается 16:0, а 18-углеродная олеиновая кислота с одной двойной связью — 18:1. Положения любых двойных связей обозначаются надстрочными номерами после греческой буквы Δ («дельта»); 20-углеродная жирная кислота с двумя двойными связями между С-9 и С-10 (при этом С-1 — углерод карбоксила) и между С-12 и С-13 обозначается как 20:2 ($\Delta^{9,12}$). ■

Наиболее распространенные жирные кислоты имеют четное число углеродных атомов в неразветвленной цепи из 12–24 углеродов (табл. 10-1). Как мы увидим в гл. 21, четное число углеродов обусловлено способом синтеза этих соединений, который основан на конденсации двухуглеродных (ацетатных) единиц.

Существует также общее правило локализации двойных связей: в большинстве мононенасыщенных жирных кислот двойная связь располагается между С-9 и С-10 (Δ^9), а в полиненасыщенных жирных кислотах последующие двойные связи обычно находятся при Δ^{12} и Δ^{15} (арахионовая кислота — исключение из этого общего правила). Двойные связи в полиненасы-

щенных жирных кислотах почти никогда не являются сопряженными (чередующимися с одной одинарной связью как в $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$), а разделены метиленовой группой: $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ (рис. 10-1, б). Почти у всех природных жирных кислот двойные связи находятся в *цис*-конфигурации. *транс*-Жирные кислоты образуются под действием ферментов в рубце жвачных животных; их можно выделить из молочных продуктов и мяса.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Для человека особенно важную роль играют **полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК)** с двойной связью между третьим и четвертым атомами углерода, считая от концевой метильной группы. Поскольку физиологическая роль ПНЖК в основном связана с положением первой двойной связи со стороны концевой *метиленовой группы*, чем со стороны карбоксильной группы, для таких жирных кислот иногда используют иную систему обозначений. Углерод метильной группы (т. е. наиболее удаленный от карбоксильной группы углерод) обозначают буквой ω и присваивают ему номер один (рис. 10-1, б). В такой системе обозначений полиненасыщенные жирные кислоты с двойной связью между атомами С-3 и С-4 называют **омега-3 (ω -3)-жирными кислотами**, а жирные кислоты с двойной связью между атомами С-6 и С-7 — **омега-6 (ω -6)-жирными кислотами**. ■

Для нормального метаболизма человеку необходима омега-3-полиненасыщенная α -линоленовая кислота (18:3 ($\Delta^{9,12,15}$) в стандартной номенклатуре), однако человек не может ее синтезировать и, следовательно, должен получать с пищей. Из α -линоленовой кислоты в организме человека синтезируются две другие важные омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты: эйкозапентаеновая кислота (ЭПК, 20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$); см. рис. 10-1, б) и докозагексаеновая кислота (ДГК, 22:6($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$)). Несбалансированность омега-3- и омега-6-полиненасыщенных жирных кислот в рационе питания повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний. Оптимальное соотношение омега-3- и омега-6-кислот лежит в диапазоне от 1:1 до 4:1, однако в пище большинства жителей Северной Америки это соотношение находится в диапазоне от 10:1 до 30:1, что увеличивает чис-

ло случаев кардиозаболеваний и инсультов. В «средиземноморской диете», приверженцы которой меньше страдают от сердечно-сосудистых заболеваний, увеличено содержание омега-3-полиненасыщенных жирных кислот за счет большого количества зеленых салатов и жирной рыбы. Рыбий жир содержит много ДГК и ЭПК, поэтому его часто прописывают пациентам с заболеваниями сердечно-сосудистой системы. ■

Физические свойства жирных кислот и соединений, их содержащих, определяются главным образом длиной и степенью ненасыщенности углеводородной цепи. Присутствие в молекуле неполярной углеводородной цепи объясняет очень низкую растворимость жирных кислот в воде. Например, растворимость лауриновой кислоты (12:0, $M_r = 200$) в воде гораздо меньше (0,063 мг/г), чем растворимость для глюкозы ($M_r = 180$; 1,100 мг/г). Чем длиннее жирная ацильная цепь и чем меньше двойных связей, тем ниже растворимость. Карбоксильная группа полярна (жирные кислоты ионизованы при нейтральных pH), что обеспечивает небольшую растворимость в воде короткоцепочечных жирных кислот.

Температуры плавления сильно зависят также от длины и степени насыщенности углеводородной цепи. При комнатной температуре (25 °C) насыщенные жирные кислоты от 12:0 до 24:0 имеют воскоподобную консистенцию, в то время как ненасыщенные жирные кислоты с такой же длиной углеродной цепи — жидкие масла. Различия в температурах плавления обусловлено упаковкой молекул жирных кислот (рис. 10-2). В полностью насыщенных молекулах свободное вращение вокруг каждой углерод-углеродной связи придает углеводородной цепи большую гибкость; наиболее стабильной их конформацией является полностью развернутая, в которой стерические затруднения минимальны. Эти молекулы могут упаковываться в квазикристаллические матрицы, где вдоль всей длины цепи в результате ван-дер-ваальсовых взаимодействий атомы образуют контакты с атомами соседних молекул. В ненасыщенных жирных кислотах *цис*-строение при двойных связях вызывает излом углеводородной цепи. Жирные кислоты с одним или несколькими такими изломами не могут упаковываться так плотно, как полностью насыщенные кислоты, вследствие чего взаимодействие между этими молекулами более слабое. Поскольку для

разрушения этих менее упорядоченных ассоциатов требуется меньше тепловой энергии, температуры плавления ненасыщенных жирных кислот значительно ниже, чем у насыщенных карбоновых кислот с той же длиной углеродной цепи.

У позвоночных свободные жирные кислоты (неэтерифицированные, со свободной карбоксильной группой) циркулируют в кровотоке в виде ковалентно связанных с белком сывороточ-

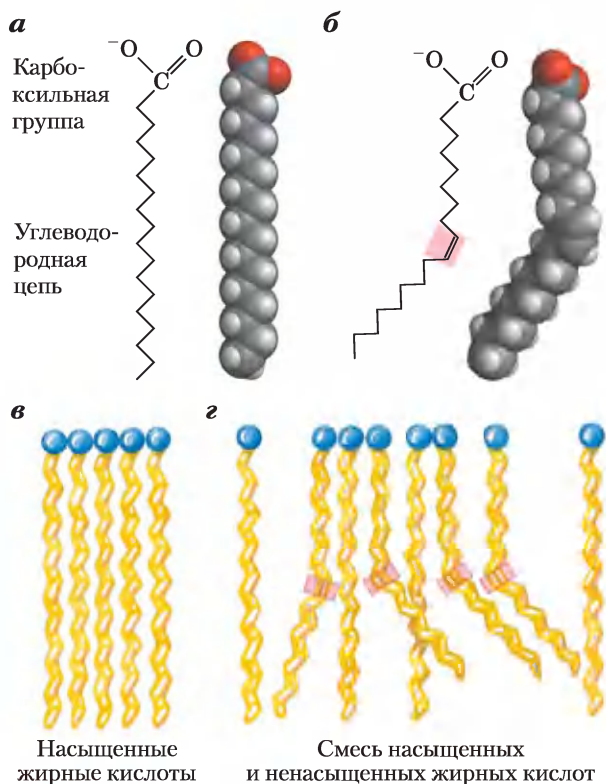
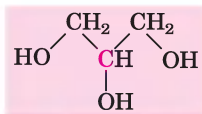


Рис. 10-2. Упаковка жирных кислот в стабильные агрегаты. Плотность упаковки зависит от степени насыщенности. **а)** Два изображения полностью насыщенной стеариновой кислоты (стеарат при pH 7) в ее обычной вытянутой конформации. В каждом линейном сегменте имеется одна одинарная связь между соседними углеродами. **б)** *цис*-Двойная связь (затенена) в олеиновой кислоте, (олеате) 18:1(Δ^9) ограничивает вращение и образует жесткий изгиб в углеводородном «хвосте». Вокруг всех других связей в цепи возможно свободное вращение. **в)** Полностью насыщенные жирные кислоты в вытянутой форме организуются в квазикристаллические матрицы, стабилизирующиеся гидрофобными взаимодействиями. **г)** Присутствие одной или более *цис*-двойных связей мешает образованию плотной упаковки и приводит к менее стабильным агрегатам.

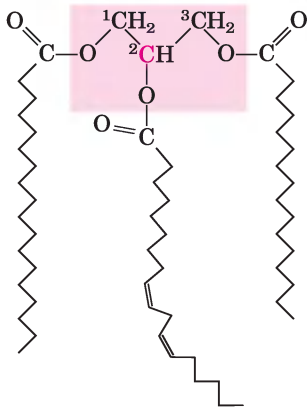
ным альбумином комплексов. В большинстве случаев, однако, жирные кислоты существуют в виде производных по карбоксильной группе, таких как сложные эфиры и амиды. Поскольку у этих производных жирных кислот отсутствует заряженная карбоксильная группа, они еще менее растворимы в воде, чем свободные жирные кислоты.

Триацилглицериды — эфиры жирных кислот и глицерина

Простейшими липидами, построенными из жирных кислот, являются **триацилглицериды**, называемые также триглицеринами, жирами и



Глицерин



1-стеарил, 2-линолеил, 3-пальмитоилглицерин — смешанный триацилглицерид

Рис. 10-3. Глицерин и триацилглицерин. Изображенный здесь смешанный триацилглицерид содержит три различные жирные кислоты, связанные с глицериновым остовом. В случае, когда глицерин содержит две разные жирные кислоты при C-1 и C-3, при углероде C-2 возникает хиральный центр (с. 36).

нейтральными жирами. В состав триацилглицеридов входят три жирные кислоты, каждая из которых образует эфирную связь с глицерином (**рис. 10-3**). Триацилглицериды с одной и той же кислотой во всех трех положениях — это простые триацилглицериды; они называются по жирной кислоте, которую содержат. Например, простые триацилглицериды кислот 16:0, 18:0 и 18:1 — тристеарин, трипальмитин и триолеин. Большинство природных триацилглицеридов смешанные; они содержат две или больше разных жирных кислот. Чтобы правильно называть эти соединения, следует точно указывать название и положение каждой жирной кислоты.

Поскольку полярные гидроксильные группы глицерина и полярные карбоксильные группы жирных кислот образуют сложноэфирную связь, триацилглицериды представляют собой неполярные гидрофобные молекулы, практически нерастворимые в воде. Липиды имеют более низкую плотность, чем вода, что объясняет, почему смеси масла и воды (например, уксусно-масляная заправка для салата) двухфазные: масло меньшей плотности плавает на поверхности воды.

Триацилглицериды обеспечивают аккумуляцию энергии и теплоизоляцию

В большинстве клеток эукариот триацилглицериды образуют особую фазу микроскопических масляных капелек в водном цитозоле; эти капельки — хранилище метаболического «топлива» (жировые депо). У позвоночных есть специализированные клетки адипоциты, или жировые клетки, они содержат большие количества триацилглицеридов в виде жировых капель, которые почти целиком заполняют клетку (**рис. 10-4, а**). Триацилглицериды в виде масел запасаются также в семенах растений многих видов, поставляя энергию для биосинтеза при прорастании семян (**рис. 10-4, б**). Адипоциты и прорастающие семена содержат **липазы** — ферменты, катализирующие гидролиз запасенных триацилглицеридов, при котором высвобождаются жирные кислоты для экспорта в те места, где требуется энергия.

При использовании в качестве депонированного топлива триацилглицериды имеют два существенных преимущества по сравнению с полисахаридами, такими как гликоген и крахмал. Прежде всего, поскольку атомы углерода в жирных кис-

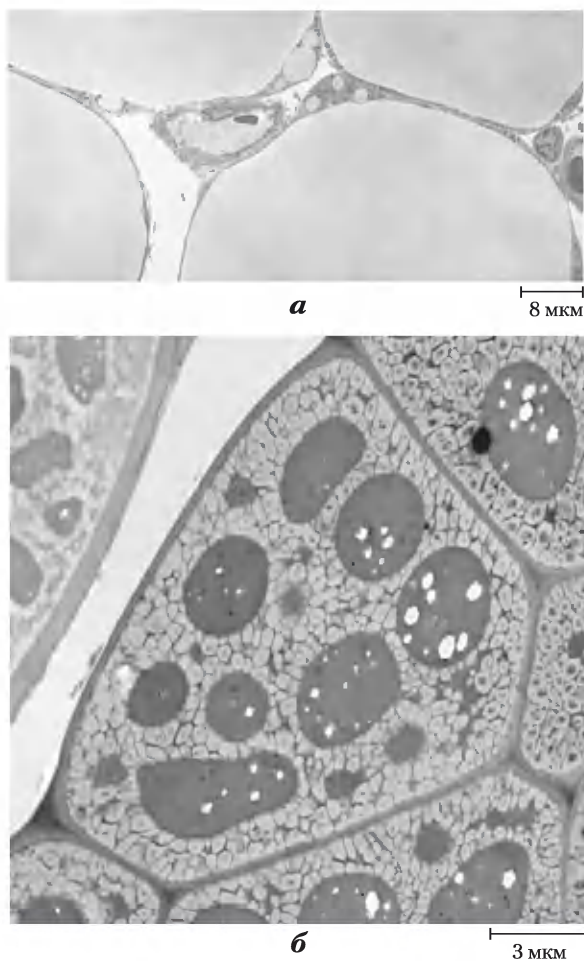


Рис. 10-4. Жировые депо в клетках. *а*) Поперечный срез четырех адипоцитов морской свинки. Гигантские жировые капли практически полностью заполняют клетки. Видно также поперечное сечение нескольких капилляров. *б*) Поперечный срез клетки семяздоли из семени растения р. *Arabidopsis*. Большие темные структуры — это белковые тельца, окруженные маслами, содержащимися в слабоокрашенных масляных тельцах.

лотах находятся в более восстановленном состоянии, чем в сахарах, окисление триацилглицеридов по сравнению с окислением углеводов дает более чем в два раза больше энергии (г/г). Во-вторых, из-за того, что триацилглицериды гидрофобны и, следовательно, не гидратированы, организм, который в качестве топлива содержит жир, избавлен от лишнего веса гидратной воды, которая связана с депонированными полисахаридами (2 г/г полисахарида). У человека жировая ткань (состоящая преимущественно из адипоцитов) находится под кожей, в брюшной полости и в молочных железах.

При умеренной тучности у человека в адипоцитах депонировано 15–20 кг триацилглицеридов, и, опустошая свои жировые депо, человек может удовлетворять энергетические нужды в течение месяцев. В противоположность этому, в форме гликогена человеческое тело может сохранять менее чем однодневный запас энергии. Углеводы (такие как гликоген и глюкоза) все же имеют некоторые преимущества перед жирами как быстрые источники метаболической энергии; кроме того, углеводы легко растворимы в воде.

У некоторых животных триацилглицериды, находящиеся под кожей, служат не только как энергетические запасы, но и для теплоизоляции при низких температурах. Тюлени, моржи, пингвины и другие теплокровные полярные животные щедро «набиты» триацилглицеридами. У впадающих в спячку животных (например, у медведя) огромные жировые запасы, накопленные перед спячкой, служат для двух целей — как энергетическое депо и для теплоизоляции (см. доп. 17-1). Триацилглицериды низкой плотности могут выполнять в организме еще одну замечательную функцию. Кашалоты благодаря запасу триацилглицеридов и восков могут менять свою плавучесть в водах с различной плотностью, что особенно важно во время глубоких погружений в холодную воду (доп. 10-1).

При частичном гидрировании кулинарного жира образуются *транс*-жирные кислоты



Большинство природных жиров содержится в растительных маслах, молочных продуктах и животных жирах; природные жиры представляют собой сложные смеси простых и смешанных триацилглицеридов. Жирные кислоты в природных жирах различаются по длине углеродной цепи и степени ее насыщенности (рис. 10-5). Растительные масла, например кукурузное и оливковое, состоят в основном из триацилглицеридов с ненасыщенными жирными кислотами, и поэтому эти масла при комнатной температуре жидкие. В промышленности их превращают в твердые жиры посредством каталитического гидрирования, при котором часть двойных связей восстанавливаются до одинарных, а другие превращаются в *транс*-двойные связи. Триацилглицериды, содержащие только насыщенные жирные кислоты, такие как тристеарин — основной компонент

Дополнение 10-1 Кашалоты: жирные головы морских глубин

Изучение кашалотов раскрыло еще одну роль триацилглицеридов в природе. Голова кашалота очень велика, она составляет более трети общей массы его тела. Около 90% массы головы приходится на долю спермацетового органа, жировой массы, которая содержит до 3600 кг (т. е. почти 4 т!) спермацетового масла — смеси триацилглицеридов и восков с множеством ненасыщенных жирных кислот. Эта смесь жидкая при нормальной температуре тела кита (около 37 °С), но начинает кристаллизоваться около 31 °С и становится твердой, когда температура опускается еще на несколько градусов.

Вывод о возможной биологической функции спермацетового масла был сделан на основании анатомии и пищевого поведения кашалота. Эти млекопитающие питаются почти исключительно кальмарами на очень большой глубине. В поисках пищи они опускаются на глубину 1000 м и более; рекордное по глубине погружение составляет 3000 м. На этих глубинах у них нет конкурентов в охоте за кальмарами; кашалот остается неподвижным, ожидая проплывающую косяками добычу.

Для того чтобы морское животное могло оставаться на данной глубине без постоянных плавательных движений, оно должно иметь ту же плотность, что и окружающая вода. Плавучесть кашалотов меняется в соответствии с плотностью окружающей среды — от поверхности тропического океана до больших глубин, где вода гораздо холоднее и, следовательно, плотнее. Ключ к объяснению заключается в температуре замерзания спермацетового масла. Когда при глубоком погружении температура кашалота понижается на несколько градусов, масло затвердевает

(кристаллизуется) и становится плотнее. Таким образом, плавучесть кита изменяется в соответствии с плотностью морской воды. Быстрому охлаждению масла в процессе погружения способствуют различные физиологические механизмы. При возвращении к поверхности затвердевшее спермацетовое масло нагревается и плавится, при этом его плотность уменьшается в соответствии с плотностью верхнего слоя воды. Иными словами, мы наблюдаем у кашалота поразительную анатомическую и биохимическую адаптацию. Триацилглицериды и воски, синтезирующиеся кашалотом, содержат жирные кислоты с необходимой длиной углеродной цепи и степенью ненасыщенности, чтобы обеспечить спермацетовому маслу надлежащую температуру плавления для глубоководного плавания животного.



К несчастью для популяции кашалотов, спермацетовое масло одно время считалось самым лучшим ламповым маслом, а сейчас продолжает представлять коммерческую ценность как смазочный материал. Несколько столетий интенсивной охоты на этих млекопитающих привели к тому, что теперь кашалоты включены в список видов, находящихся под угрозой исчезновения.

говяжьего жира, образуют при комнатной температуре белый твердый жир.

Когда продукты, богатые липидами, слишком долго подвергаются действию кислорода воздуха, они могут испортиться, т. е. прогоркнуть. Неприятный вкус и запах, связанные с этим, обусловлены окислительным расщеплением двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах, при котором образуются альдегиды и карбоновые кислоты с более короткой углеродной цепью и, следовательно, обладающие большей летучестью. Для улучшения сохранности растительных масел, использующихся в приготовлении пищи, а также для повышения их стабильности при высокой температуре, при которой происходит

жарка во фритюре, коммерческие растительные масла подвергаются частичному гидрированию. В результате этого процесса многие *цис*-двойные связи превращаются в одинарные связи, а температура плавления таких жиров повышается, при комнатной температуре они находятся в твердом состоянии (так, например, из растительных масел получают маргарин). Частичному гидрированию сопутствует и другой, нежелательный эффект: некоторые *цис*-двойные связи превращаются в *транс*-двойные связи. Сегодня уже хорошо известно, что употребление в пищу большого количества *транс*-жирных кислот (часто называемых просто *транс*-жирами) приводит к увеличению риска развития сердечно-

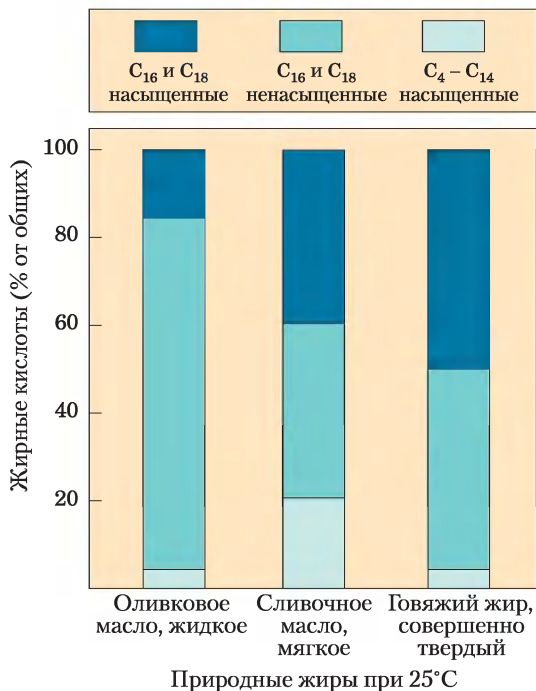


Рис. 10-5. Жирнокислотный состав трех пищевых жиров. Оливковое масло, сливочное масло и говяжий жир состоят из смесей триацилглицеридов, различающихся по составу жирных кислот. Температура плавления этих жиров и, следовательно, их физическое состояние при комнатной температуре (25 °С) напрямую зависят от жирных кислот в их составе. Оливковое масло характеризуется высоким содержанием длинноцепочечных (С₁₆ и С₁₈) ненасыщенных жирных кислот, которые обеспечивают его жидкое состояние при 25 °С. Более высокое содержание длинноцепочечных (С₁₆ и С₁₈) насыщенных жирных кислот в сливочном масле повышает температуру плавления, так что при комнатной температуре масло бывает мягким. Говяжий жир с еще более высоким содержанием длинноцепочечных насыщенных жирных кислот совершенно твердый.

сосудистых заболеваний, поэтому-то отсутствие таких кислот в рационе питания значительно снижает риск ишемической болезни сердца. Поступление *транс*-жиров в организм приводит к увеличению в крови уровня триглицеридов и липопротеинов низкой плотности («плохого» холестерина) и понижению уровня липопротеинов высокой плотности («хорошего» холестерина). Этих изменений уже вполне достаточно, чтобы повысить риск заболеваний сердечно-сосудистой системы. Но плохое действие *транс*-

жиров на этом не заканчивается. По-видимому, они усиливают воспалительные процессы в организме, что является дополнительным фактором, повышающим вероятность развития болезней сердца. О свойствах липопротеинов низкой и высокой плотности (ЛПНП и ЛПВП) подробнее см. в гл. 21.

Многие продукты быстрого приготовления (фаст-фуд) готовят во фритюре в частично гидрогенизированном растительном масле, содержащем много *транс*-жиров (см. табл. 10-2). В связи с отрицательным воздействием *транс*-жиров на здоровье человека в некоторых странах (таких как Дания) и отдельных городах США (Нью-Йорк, Филадельфия) введен запрет на использование в ресторанах частично гидрогенизированных масел. Жареный картофель «фри», приготовленный в датских ресторанах фаст-фуд, практически не содержит *транс*-жиров, а тот же продукт, приготовленный в США, содержит от 5 до 10 г *транс*-жирных кислот на порцию. Известно, что вредное действие *транс*-жиров сказывается при употреблении от 2 до 7 г в день (от 20 до 60 калорий при суточной норме 2000 калорий; заметьте, что «калория» в диетологии соответ-

Таблица 10-2	<i>транс</i> -Жиры в некоторых распространенных закусках и блюдах быстрого приготовления	
	В стандартной порции (г)	Доля от всех жирных кислот (%)
Картофель «фри»	4,7–6,1	28–36
Бутерброд с рыбой в панировке	5,6	28
Бутерброд с куриной котлетой	5,0	25
Пицца	1,1	9
Кукурузные чипсы	1,6	22
Пончики	2,7	25
Сдобная булка	0,7	14
Шоколадный батончик	0,2	2

Источник: с изменениями табл. 1 из Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, P Stampfer, H., M.J., & Willet, W.C. (2006) Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1604–1605.

Все данные приведены для продуктов питания, приготовленных на частично гидрогенизированном растительном масле в США в 2002 г.

ствуует килокалории в химии и биохимии). Итак, одна порция картофеля «фри» в американском ресторане может содержать такое вот большое количество *транс*-жиров! Многие другие готовые продукты, хлебобулочные изделия и легкие закуски из супермаркетов также содержат достаточно много *транс*-жиров. ■

Воски служат хранилищами энергии и водоотталкивающими средствами

Природные воски представляют собой эфиры длинноцепочечных (C_{14} – C_{36}) насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и длинноцепочечных (C_{16} – C_{30}) спиртов (рис. 10-6). Температуры плавления восков (60–100 °С) обычно выше, чем у триацилглицеридов. В планктоне – пассивно плавающих микроорганизмах, представляющих самый низший уровень в цепи питания морских животных, воски являются главной формой хранения метаболического топлива.

Воски выполняют также множество других функций, обусловленных их твердой консистен-

цией и водоотталкивающими свойствами. У позвоночных специальные кожные железы выделяют воски для того, чтобы защитить кожу и волосы и сохранять их мягкими, гладкими и водоустойчивыми. Птицы, особенно водоплавающие, выделяют воски из копчиковой (сальной) железы для поддержания водоотталкивающих свойств перьев. При солнечном освещении листья падубы, рододендронов, ядовитого плюща и многих тропических растений покрыты толстым слоем воска, который предотвращает избыточное испарение воды и защищает от паразитов.

Биологические воски находят самое разнообразное применение в фармацевтической, косметической и других отраслях промышленности. Ланолин (из овечьей шерсти), пчелиный воск (рис. 10-6), карнубский воск (из бразильской пальмы) и воск, экстрагированный из спермацетового масла (китов, см. доп. 10-1), широко используются в производстве лосьонов, мазей и лаков.

Краткое содержание раздела 10.1 ЗАПАСНЫЕ ЛИПИДЫ

- Липиды – нерастворимые в воде клеточные компоненты различного строения, которые можно экстрагировать неполярными растворителями.
- Почти все жирные кислоты (углеводородные компоненты многих липидов) имеют четное число атомов углерода (обычно 12–24); они могут быть насыщенными или ненасыщенными, при этом двойные связи почти всегда имеют *цис*-конфигурацию.
- Триацилглицериды содержат три остатка жирных кислот, образующих сложноэфирные связи по трем гидроксильным группам глицерина. Простые триацилглицериды содержат остатки только одной жирной кислоты; смешанные триацилглицериды – двух или трех. Триацилглицериды – главным образом запасные жиры, они содержатся во многих пищевых продуктах.
- При частичном гидрировании растительных масел в пищевой промышленности происходит переход некоторых *цис*-двойных связей



б

Рис. 10-6. Биологический воск. а) Триаоктаноилпальмитат, основной компонент пчелиного воска, — эфир пальмитиновой кислоты и спирта триаоктанола. б) Пчелиные соты, построенные из пчелиного воска, при 25 °С твердые и совершенно не пропускают воду. Термин «воск» происходит от староанглийского *weax*, означающего материал пчелиных сот.

в *транс*-конфигурацию. Включение *транс*-жиров в рацион питания повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний.

10.2. Структурные липиды в мембранах

Биологические мембраны состоят из двойного слоя липидов, который служит барьером для проникновения полярных молекул и ионов. Мембранные липиды проявляют амфифильные свойства: один конец их молекул гидрофобный, другой — гидрофильный. Благодаря гидрофильным взаимодействиям с водой их агрегаты из молекул образуют упаковку в виде пластов, называемых мембранными бислоями. В этом разделе мы опишем пять главных типов мембранных липидов: глицерофосфолипиды, в которых гидрофобные области представлены остатками двух жирных кислот, связанными с глицерином; галактолипиды и сульфоллипиды содержат также две жирные кислоты, этерифицированные глицерином, но здесь, в отличие от фосфолипидов, отсутствует фосфат; тетраэфирные липиды архей, в которых две очень длинные алкильные цепи связаны простой эфирной связью с глице-

рином обоими концами; сфинголипиды, в которых одна жирная кислота связана с жирным амином сфингозином; и стеринны, соединения с жесткой системой из четырех конденсированных углеводородных колец.

Гидрофильные области в этих амфифильных соединениях могут быть представлены простыми функциональными группами, как, например, на одном конце кольцевой системы стерина всего одна группа —ОН, но гидрофильные свойства могут быть обусловлены и гораздо более сложной структурой. В глицерофосфолипиде и некоторых сфинголипиде полярная группа «головки» присоединяется к гидрофобной части фосфодиэфирной связью; это **фосфолипиды**. Другие сфинголипиды не содержат фосфата, но несут на своих полярных концах простой сахар или сложный олигосахарид; это **гликолипиды** (рис. 10-7). Мембранные липиды чрезвычайно разнообразны, что обусловлено различными комбинациями жирнокислотных «хвостов» и полярных «головок». Расположение фосфолипидов в мембранах и структурная и функциональная роль, которую они там играют, будут рассмотрены в следующей главе.

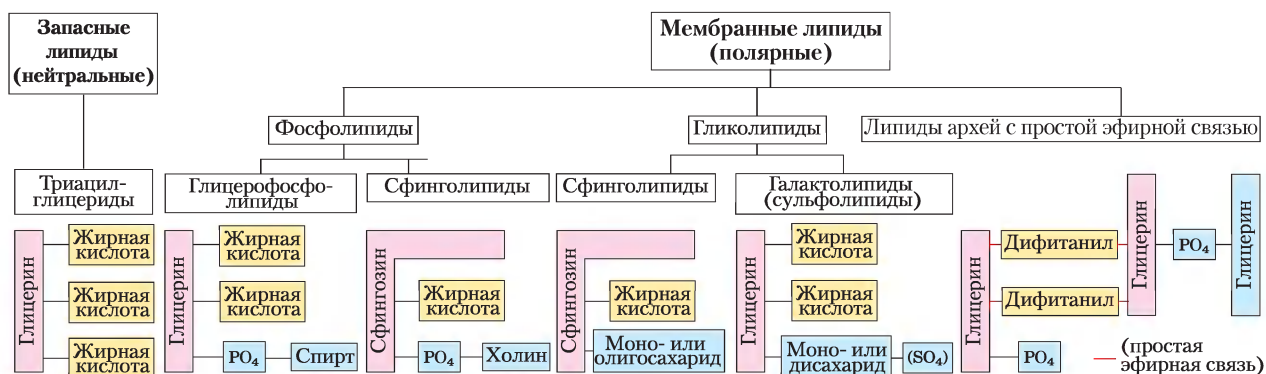


Рис. 10-7. Некоторые широко распространенные типы запасных и мембранных липидов.

Все изображенные здесь липиды имеют в своем составе либо глицерин, либо сфингозин в качестве основы (скелета) (розовые полоски), с которыми связаны одна или более длинноцепочечных алкильных групп (желтые) и полярные «головки» (голубые). В триацилглицеридах, глицерофосфолипиде, галактолипиде и сульфоллипиде алкильные цепи — это остатки жирных кислот, образующих сложноэфирную связь. Сфинголипиды содержат одну-единственную жирную кислоту, образующую амидную связь со сфингозиновым скелетом. Мембранные липиды архей содержат очень длинные разветвленные алкильные цепи, каждый конец которых образует простую эфирную связь с глицериновой частью. В фосфолипиде полярная «головка» присоединяется через фосфодиэфирную связь, в то время как в гликолипиде гликозидная связь напрямую соединяет сахар «головки» и глицерин.

Глицерофосфолипиды — производные фосфатидной кислоты

Глицерофосфолипиды, называемые также фосфоглицеридами, — это мембранные липиды, у которых остатки двух жирных кислот связаны сложноэфирной связью с первым и вторым углеродными атомами глицерина, а к третьему углероду фосфодиэфирной связью присоединена сильно полярная или заряженная группа. Глицерин — прохиральная структура; в нем нет асимметрических атомов углерода, но присутствие связанного фосфата на одном конце превращает его в хиральное соединение, которое правильно называется L-глицеро-3-фосфат-D-глицеро-1-фосфатом либо *sn*-глицеро-3-фосфатом (рис. 10-8). Глицерофосфолипиды получают названия как производные исходного соединения — фосфатидной кислоты (рис. 10-9) — в зависимости от типа полярного спирта в «головке».

Например, фосфатидилхолин и фосфатидилэтанолламин содержат в своих полярных «головках» холин и этанолламин соответственно. Во всех этих соединениях группа «головки» соединена с глицерином фосфодиэфирной связью, в которой фосфатная группа несет отрицательный

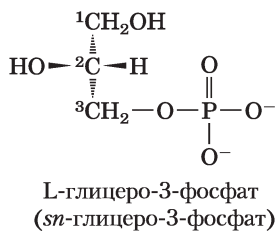


Рис. 10-8. L-глицеро-3-фосфат, основа фосфолипидов.

Сам по себе глицерин не хиральная молекула, поскольку имеет плоскость симметрии, которая проходит через C-2. Однако глицерин можно превратить в хиральное соединение, введя заместитель, такой как фосфат, к любой из групп $-\text{CH}_2\text{OH}$, т. е. глицерин прохирален. Для глицерофосфатов используется DL-номенклатура (см. с. 117), где изомеры называют согласно их стереохимическому родству с изомерами глицеральдегида. В этой номенклатуре стереоизомеры глицерофосфата большинства липидов правильно называть L-глицеро-3-фосфат и D-глицеро-1-фосфат. В другой номенклатуре используют стереоспецифическую нумерацию (*sn*-система), и, по определению, C-1 — та группа прохирального соединения, которая занимает про-*S*-положение. В этой номенклатуре глицерофосфат в фосфолипидах называется *sn*-глицеро-3-фосфат.

заряд при нейтральных pH. Полярный спирт может быть заряженным отрицательно (как в фосфатидилинозит-4,5-бисфосфате), нейтральным (фосфатидилсерин) или заряженным положительно (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин). Как мы увидим в гл. 11, эти заряды вносят очень существенный вклад в поверхностные свойства мембран.

В состав глицерофосфолипидов могут входить любые природные жирные кислоты. Например, фосфатидилхолины могут иметь разный состав, каждый содержит свой уникальный набор жирных кислот. Распределение разных видов молекул специфично для различных организмов, разных тканей одного и того же организма и различных глицерофосфолипидов в одной и той же клетке или ткани. Как правило, глицерофосфолипиды содержат C_{16} - или C_{18} -насыщенную жирную кислоту при C-1 и C_{18} - C_{20} -ненасыщенную жирную кислоту при C-2. За редким исключением, биологическая роль вариаций жирных кислот и групп «головки» пока остается неясной.

В некоторых фосфолипидах жирные кислоты присоединены через простую эфирную связь

Некоторые ткани животных и одноклеточные организмы богаты липидами, в которых одна из двух ацильных цепей образует с глицерином простую эфирную, а не сложноэфирную связь. Связанная простой эфирной связью цепь может быть насыщенной, как в алкилэфирных липидах, или может содержать двойную связь между C-1 и C-2, как в плазмалогенах (рис. 10-10). Сердечная ткань позвоночных уникально богата липидами с простой эфирной связью; около половины сердечных липидов составляют плазмалогены. В мембранах галофильных бактерий, инфузорий и некоторых беспозвоночных также высоко содержание липидов с простой эфирной связью. Функциональная роль липидов с простой эфирной связью в этих мембранах неизвестна; возможно, их устойчивость к фосфолипазам, отщепляющим от мембранных липидов жирные кислоты, связанные сложноэфирной связью, важна для некоторых функций.



По крайней мере, один липид с простой эфирной связью, **фактор активации тромбоцитов**, может выполнять роль сигнальной молекулы. Он высвобождается из лейкоцитов,

Название глицерофосфолипид	Название X—O	Формула X	Общий заряд (при pH 7)
Фосфатидная кислота	—	— H	—1
Фосфатидилэтаноламин	Этаноламин	— CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ ⁺	0
Фосфатидилхолин	Холин	— CH ₂ —CH ₂ —N ⁺ (CH ₃) ₃	0
Фосфатидилсерин	Серин	— CH ₂ —CH—NH ₃ ⁺ COO ⁻	—1
Фосфатидилглицерин	Глицерин	— CH ₂ —CH—CH ₂ —OH OH	—1
Фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат	<i>мио</i> -Инозит-4,5-бисфосфат		—4
Кардиолипин	Фосфатидилглицерин		—2

Рис. 10-9. Глицерофосфолипиды. Из глицерофосфолипидов наиболее распространены диацилглицериды, в которых остатки спиртов «головки» связаны фосфодизэфирной связью. Фосфатидная кислота, фосфомоноэфир, служит исходным соединением. Каждое производное называется по спиртовой группе «головки» (X), с приставкой «фосфатидил-». В кардиолипине две молекулы фосфатидной кислоты делят один глицерин. R¹ и R² — остатки жирных кислот.

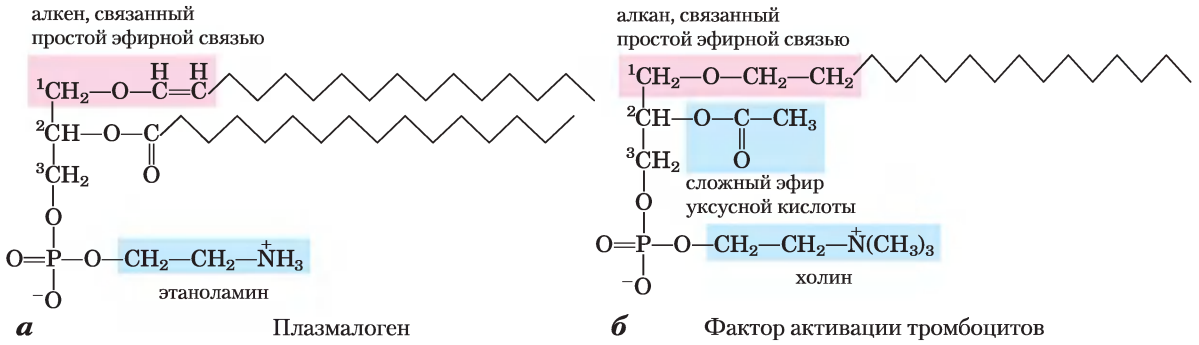


Рис. 10-10. Липиды с простой эфирной связью. Плазмалогены содержат связанную простой эфирной связью алкенильную цепь в том месте, где у большинства глицерофосфолипидов находится связанная сложноэфирной связью жирная кислота (сравните с рис. 10-9). Фактор активации тромбоцитов несет связанную простой эфирной связью длинную алкильную цепь при атоме С-1 глицерина, но в положении С-2 находится связанный сложноэфирной связью остаток уксусной кислоты, что делает это соединение гораздо более растворимым в воде, чем большинство глицерофосфолипидов и плазмалогенов. Спиртом «головки» и в плазмалогенах, и в факторе активации тромбоцитов является холин.

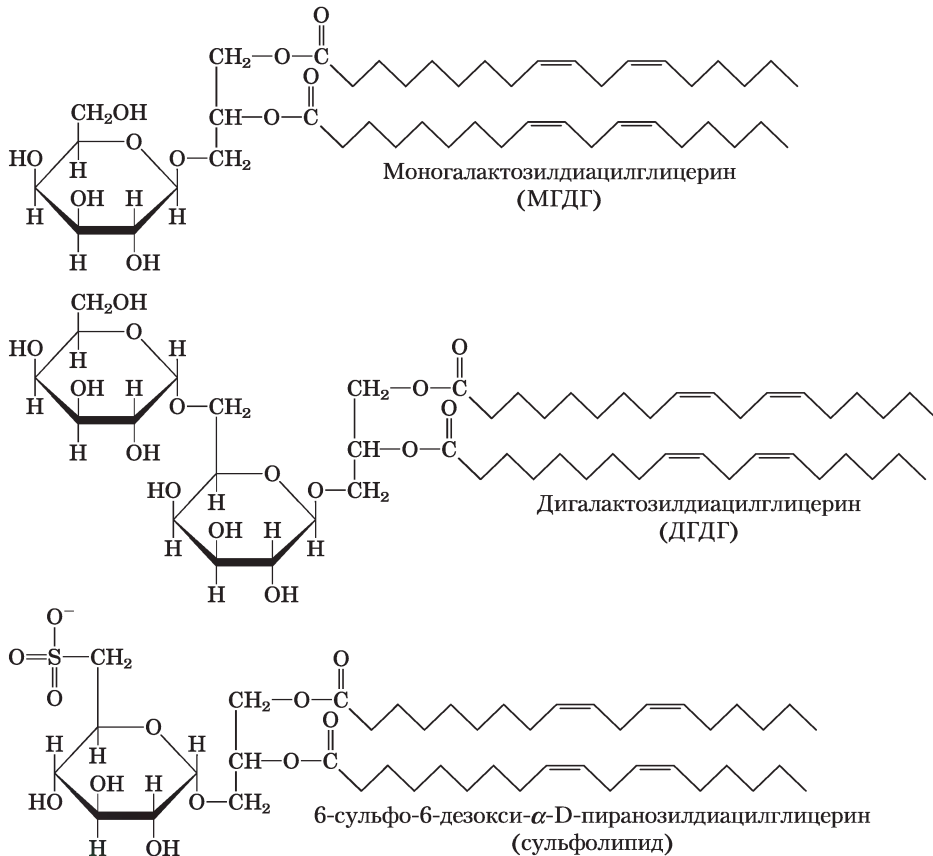


Рис. 10-11. Три гликолипида мембран тилакоидов хлоропластов. В моногалактозилдиацилглицеридах (МГДГ) и дигалактозилдиацилглицеридах (ДГДГ) почти все ацильные группы происходят из линолевой кислоты (18:2($\Delta^{9,12}$)), и группы «головки» не заряжены. В сульфолипиде 6-сульфо-6-дезоксид- α -D-глюкопиранозилдиацилглицериде сульфонат несет фиксированный отрицательный заряд.

называемых базофилами, и стимулирует агрегацию тромбоцитов и высвобождение серотонина (вазоконстриктора — сосудосуживающего агента). Он также оказывает разнообразные эффекты на печень, гладкую мускулатуру, сердце, ткани матки и легких и играет важную роль при воспалительных и аллергических реакциях. ■

Хлоропласты содержат галактолипиды и сульфоллипиды

Вторую группу мембранных липидов составляют **галактолипиды** — липиды, преобладающие в растительных клетках; в них один или два остатка галактозы связаны с атомом С-3 1,2-диацилглицерина гликозидной связью (рис. 10-11, см. также рис. 10-7). Галактолипиды локализованы в тилакоидных мембранах (внутренние мембраны) хлоропластов; на их долю приходится 70–80% всех мембранных липидов сосудистых растений. По всей вероятности, это самые распространенные в биосфере липиды. Часто количество фосфата как питательного компонента почвы ограничено, и, возможно, эволюция протекала так, чтобы сохранить фосфат для

более важных целей, поэтому растения создали липиды, не содержащие фосфат. В мембранах растений встречаются также сульфоллипиды, в которых сульфонируемый остаток глюкозы присоединяется к диацилглицерину гликозидной связью. В сульфоллипиде сульфонат «головки» несет фиксированный отрицательный заряд подобно фосфатной группе в фосфолипидах (рис. 10.11).

Археи содержат уникальные мембранные липиды

У архей, большинство которых существуют в экологических нишах с экстремальными условиями, например при высокой температуре (кипящей воды), низком рН, высокой ионной силе, мембранные липиды содержат длинноцепочечные (32 атома углерода) разветвленные углеводороды, каждым концом соединенные с глицерином (рис. 10-12). Простые эфирные связи этих соединений гораздо устойчивее к гидролизу при низких рН и высокой температуре, чем сложноэфирные связи, найденные в липидах бактерий и эукариот. В полностью вытя-

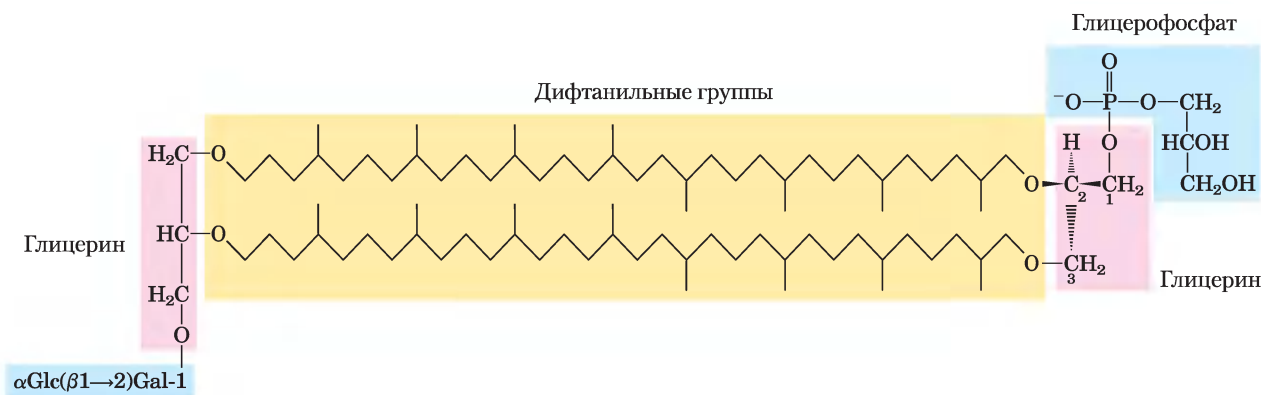


Рис. 10-12. Типичный липид мембраны архей. В этом дифтанилтетраэфирном липиде дифтанильные участки (желтые) — это длинные углеводороды, составленные из восьми пятиуглеродных изопреновых групп, сконденсированных конец к концу (о конденсации изопреновых единиц см. рис. 21-36; ср. также дифтанилтные группы с 20-углеродной фитиновой боковой цепью хлорофилла на рис. 19-47, а). В данной протяженной форме дифтанильные группы примерно вдвое длиннее, чем 16-углеродная жирная кислота, обнаруживаемая обычно в мембранных липидах бактерий и эукариот. Глицериновые участки в липидах архей находятся в *R*-конфигурации, а в липидах бактерий и эукариот они имеют *S*-конфигурацию. Липиды архей отличаются и заместителями в глицериновой части. В молекуле, которая здесь изображена, один глицерин связан с дисахарид- α -глюкопиранозил-(1→2)- β -галактофуранозой; другой глицерин соединен с глицерофосфатной «головкой».

нутой форме липиды архей в два раза длиннее, чем фосфолипиды и сфинголипиды, и простираются на всю ширину наружной мембраны. На каждом конце этой протяженной молекулы находится полярная «головка», состоящая из глицерина, связанного с остатком либо фосфата, либо сахара. Общее название этих соединений глицериндиалкилглицеринтетраэфиры (ГДГТ) отражает их уникальную структуру. Глицериновая часть липидов архей не тот же стереоизомер,

что в липидах бактерий и эукариот; центральный углерод находится в *R*-конфигурации у архей, а в других «царствах» — в *S*-конфигурации (рис. 10-8).

Сфинголипиды — производные сфингозина

Сфинголипиды — четвертый большой класс мембранных липидов — также состоят из полярной «головки» и двух неполярных «хвостов», но,

Название сфинголипида	Название X—O	Формула X
Церамид	—	—H
Сфингомиелин	Фосфохолин	
Нейтральные гликолипиды Глюкозилцереброзид	Глюкоза	
Лактозилцерамид (глобозид)	Ди-, три- или тетрасахарид	
Ганглиозид GM2	Сложный олигосахарид	

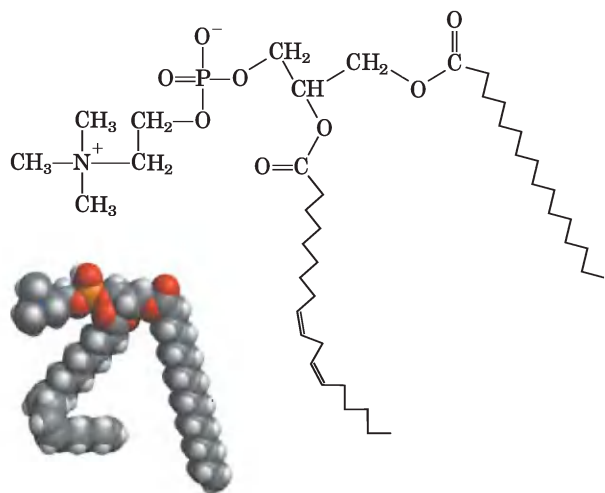


Йохан Тудикум,
1829–1901

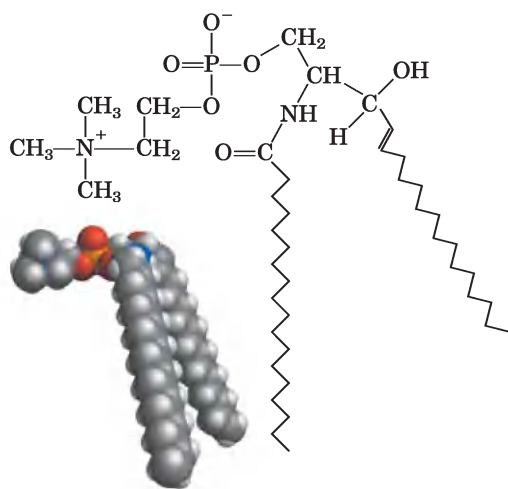
Рис. 10-13. Сфинголипиды. Первые три углерода на полярном конце сфингозина аналогичны трем углеродам глицерина в глицерофосфолипидах. Аминогруппа при С-2 образует амидную связь с жирной кислотой. Эта жирная кислота обычно насыщенная или мононенасыщенная, с 16, 18, 22 или 24 углеродными атомами. Церамид — простейшее соединение данной группы. Другие сфинголипиды отличаются полярной группой «головки» (X), связанной с С-1. Ганглиозиды имеют очень сложные олигосахаридные «головки». Здесь используются стандартные сокращения для сахаров (см. табл. 7-1).

в отличие от глицерофосфолипидов и галактолипидов, они не содержат глицерина. Сфинголипиды несут одну молекулу длинноцепочечного аминспирта сфингозина (4-сфингенина) или одного из его производных, одну молекулу длинноцепочечной жирной кислоты и полярную «головку», которая в одних случаях соединена гликозидной связью, в других — фосфодиэфирной (рис. 10-13).

Углероды С-1, С-2 и С-3 в сфингозине аналогичны трем углеродам глицерина в глицерофосфолипидах. Когда жирная кислота присоединя-



Фосфатидилхолин



Сфингомиелин

Рис. 10-14. Сходство формы и молекулярной структуры фосфатидилхолина (глицерофосфолипид) и сфингомиелина (сфинголипид) хорошо видно при сравнении структурных формул и пространственных моделей.

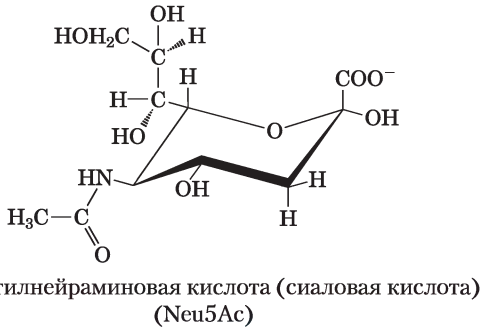
ется амидной связью к $-\text{NH}_2$ при С-2, получается **церамид**, который по строению похож на диацилглицерин. Церамид — это структурный «прародитель» сфинголипидов.

Существуют три подкласса сфинголипидов, все они производные церамида, но имеют различия в полярных «головках»: сфингомиелины, нейтральные (незаряженные) гликолипиды и ганглиозиды. **Сфингомиелины** содержат фосфохолин или фосфоэтаноламин в качестве полярных групп «головки» и поэтому относятся наряду с глицерофосфолипидами к фосфолипидам (рис. 10-7). Действительно, по свойствам и трехмерной структуре сфингомиелины напоминают фосфатидилхолины, их полярные «головки» также не несут заряда (рис. 10-14). Сфингомиелины присутствуют в плазматических мембранах животных клеток, особенно важное место они занимают в миелине — мембранной оболочке, которая окружает и изолирует аксоны некоторых нейронов; отсюда и название «сфингомиелины».

Гликофосфинголипиды, которые находятся, главным образом, на внешней поверхности плазматических мембран, содержат группы «головки» из одного или более сахаров, связанных непосредственно с ОН-группой углерода С-1 церамидной части; в них нет фосфата. **Цереброзиды** несут единственный сахар, связанный с церамидом; обнаружено, что цереброзиды с галактозой характерны для плазматических мембран клеток нервной ткани, а цереброзиды, содержащие глюкозу, находятся в плазматических мембранах клеток других тканей. **Глобозиды** — нейтральные (незаряженные) гликофосфинголипиды с двумя или более сахарами, которые обычно представлены D-глюкозой, D-галактозой или N-ацетил-D-галактозамином. Цереброзиды и глобозиды иногда называют **нейтральными гликолипидами**, поскольку при рН 7 они не имеют заряда.

Ганглиозиды, самые сложные сфинголипиды, в качестве полярных «головок» содержат на концах олигосахариды и один или более остатков N-ацетилнейраминовой кислоты (Neu5Ac), (часто ее называют просто сиаловой кислотой). Сиаловая кислота придает ганглиозидам отрицательный заряд при рН 7, и это отличает их от глобозидов. Ганглиозиды с одним остатком сиаловой кислоты входят в серию GM (M от моно-),

с двумя остатками — в серию GD (D от ди-) и т. д. (GT означает три остатка сиаловой кислоты, GQ — четыре).



Сфинголипиды на поверхностях клеток — участки биологического распознавания

Когда более ста лет назад врач и химик Йохан Тудикум открыл сфинголипиды, их биологическая роль казалась загадочной, как сфинкс (отсюда и название). В клеточных мем-

бранах человека выявлено по крайней мере 60 различных сфинголипидов. Многими из них особенно богаты плазматические мембраны нейронов, некоторые, несомненно, служат распознающими участками на клеточной поверхности, но до сих пор только для нескольких сфинголипидов открыта их специфическая функция. Углеводные части некоторых сфинголипидов характеризуют группы крови людей и, таким образом, определяют тип крови, которую человек может безопасно получать при переливаниях (рис. 10-15).

Ганглиозиды сконцентрированы на внешней поверхности клеток и представляют собой точки узнавания для внеклеточных молекул или поверхностей соседних клеток. Виды и количество ганглиозидов в плазматической мембране разительно изменяются в процессе эмбрионального развития. Образование опухоли индуцирует синтез нового компонента ганглиозидов, и было установлено, что очень низкие концентрации специфического ганглиозида индуцируют дифференцировку в культуре опухолевых клеток нервной ткани. Изучение биологических функций различных ганглиозидов остается плодотворной основой для будущих исследований.

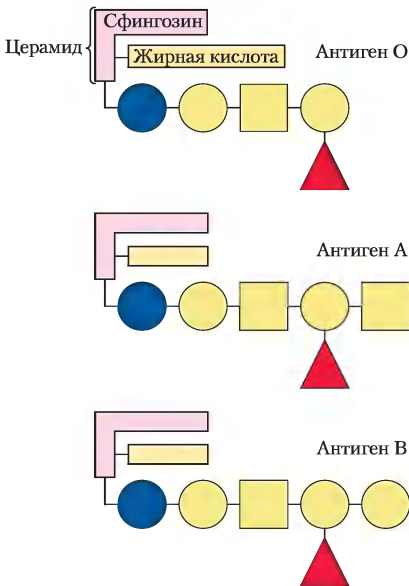


Рис. 10-15. Гликофосфинголипиды как факторы, определяющие группу крови. Группы крови человека (O, A, B) отчасти определяются олигосахаридными «головками» (показаны голубым) этих гликофосфинголипидов. Обнаружено также, что три определенных олигосахаридов связаны с некоторыми белками крови людей с типами крови O, A и B соответственно. Здесь использованы стандартные обозначения сахаров (см. табл. 7-1).

Фосфолипиды и сфинголипиды разрушаются в лизосомах

В большинстве клеток мембранные липиды непрерывно разрушаются и замещаются новыми. Для каждой гидролизуемой связи в лизосомах содержится специфический гидролитический фермент (рис 10-16). Фосфолипазы типа A удаляют одну из двух жирных кислот, образуя лизофосфолипид (эти эстеразы не разрушают простую эфирную связь в плазмалогенах). Лизофосфолипазы удаляют оставшуюся жирную кислоту.

Ганглиозиды разлагаются под действием целого набора лизосомальных ферментов, которые катализируют поэтапное удаление сахарных звеньев и образуют в конце концов церамид. Генетический дефект в любом из этих гидролитических ферментов приводит к накоплению в клетке ганглиозидов, что сопровождается тяжелыми последствиями для здоровья (доп. 10-2).

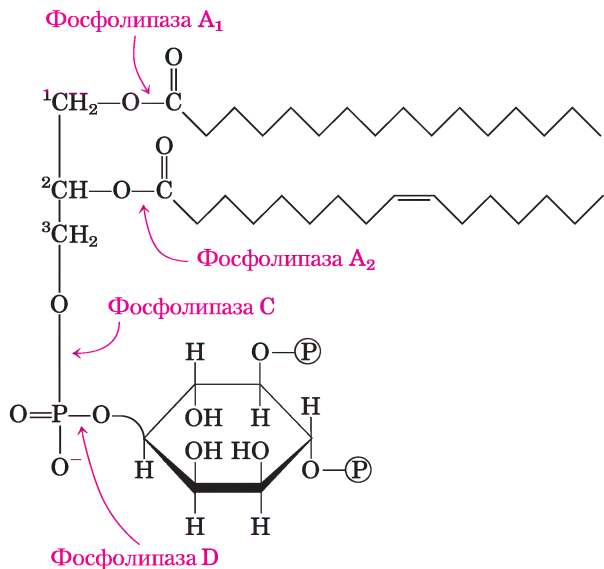


Рис. 10-16. Специфичность фосфолипаз. Фосфолипазы A_1 и A_2 гидролизуют сложноэфирные связи целых (интактных) глицерофосфолипидов в положениях C-1 и C-2 глицерина. Когда одна из жирных кислот удаляется фосфолипазой A, вторая жирная кислота отщепляется от молекулы лизофосфолипазой (не показана). Фосфолипазы C и D расщепляют каждая одну из фосфодиэфирных связей в «головке». Некоторые фосфолипазы действуют только на один тип глицерофосфолипидов, например, на фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат (изображен на рисунке) или на фосфатидилхолин; другие менее специфичны.

Стерины имеют четыре конденсированных углеродных кольца

Структурные липиды **стерины** присутствуют в мембранах большинства клеток эукариот. Характерной структурой в молекулах этой пятой группы мембранных липидов является стероидное ядро, состоящее из четырех конденсированных колец, три из которых содержат шесть атомов углерода, а одно — пять (**рис. 10-17**). Стероидное ядро почти планарное и относительно жесткое; конденсированные кольца делают невозможным вращение вокруг связей C—C. **Холестерин**, главный стерин в тканях животных, проявляет амфифильные свойства, поскольку содержит полярную «головку» (гидроксильная группа при C-3) и большую неполярную углеводородную часть (стероидное ядро и боковая углеводородная цепь при C-17), по длине примерно равную 16-углеродной жирной кислоте. Похожие стерины найдены и у других эукариот, например сигмастерин

у растений и эргостерин у грибов. Бактерии не могут синтезировать стерины, однако несколько видов бактерий могут включать экзогенные стерины в свои мембраны. Стерины всех эукариот, так же как жирорастворимые витамины, хиноны и долихолы, описанные в разд. 10.3, синтезируются из простых пятиуглеродных изопреновых субъединиц.

Помимо роли мембранных компонентов, стерины служат предшественниками разнообразных продуктов, обладающих специфической биологической активностью, например стероидные гормоны — мощные биологические сигнальные молекулы, регулирующие экспрессию генов. Желчные кислоты являются полярными производными холестерина, которые действуют как детергенты в кишечнике, эмульгируя поступающие с пищей жиры с тем, чтобы сделать их более легкодоступными для пищеварительных липаз.

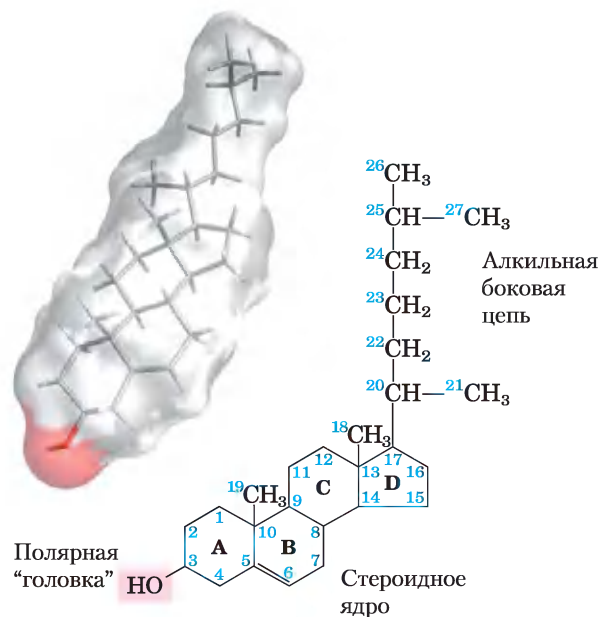


Рис. 10-17. Холестерин. Смоделированная из палочек структура холестерина видна сквозь контур объемной модели молекулы. В химической структуре кольца обозначены буквами A–D, чтобы упростить номенклатуру производных стероидного ядра, а атомы углерода пронумерованы цифрами (голубого цвета). Гидроксильная группа (розовая на обоих изображениях молекулы) при C-3 и есть полярная «головка». Для депонирования и транспорта стерина эта гидроксильная группа конденсируется с жирной кислотой, образуя сложный эфир стерина.

Полярные липиды мембран претерпевают непрерывный метаболический круговорот, скорость их синтеза обычно уравнивается скоростью распада. Распад (деградация) липидов осуществляется гидролитическими ферментами в лизосомах, причем каждый фермент способен гидролизовать только одну определенную связь. Если деградация сфинголипида нарушается в результате дефекта в одном из этих ферментов (рис. 1), в тканях накапливаются продукты неполного распада, вызывая серьезные заболевания.

Например, причиной болезни Нимана–Пика является редкий генетический дефект фермента сфингомиелиназы, которая отщепляет от сфингомиелина фосфохолин. Сфингомиелин накапливается в головном мозге, селезенке и печени. Болезнь проявляется в раннем детстве и приводит к замедленному умственному раз-

витию и ранней смерти. Чаще встречается болезнь Тея–Сакса, при которой ганглиозид GM2 накапливается в мозге и селезенке (рис. 2) из-за недостатка фермента гексоаминидазы А. Симптомами этой болезни являются прогрессирующее замедление развития, паралич, слепота и смерть в возрасте 3–4 лет.

Генетические консультации могут предсказать и предотвратить многие наследственные болезни. При тестировании будущих родителей удается выявлять аномальные ферменты, затем при анализе ДНК — определить точную природу генетического дефекта; таким образом возможно оценить опасность для потомства. При наступлении беременности таким же образом можно тестировать пробы, взятые из плаценты (ворсинки хориона) или из околоплодной жидкости (амниоцентез).

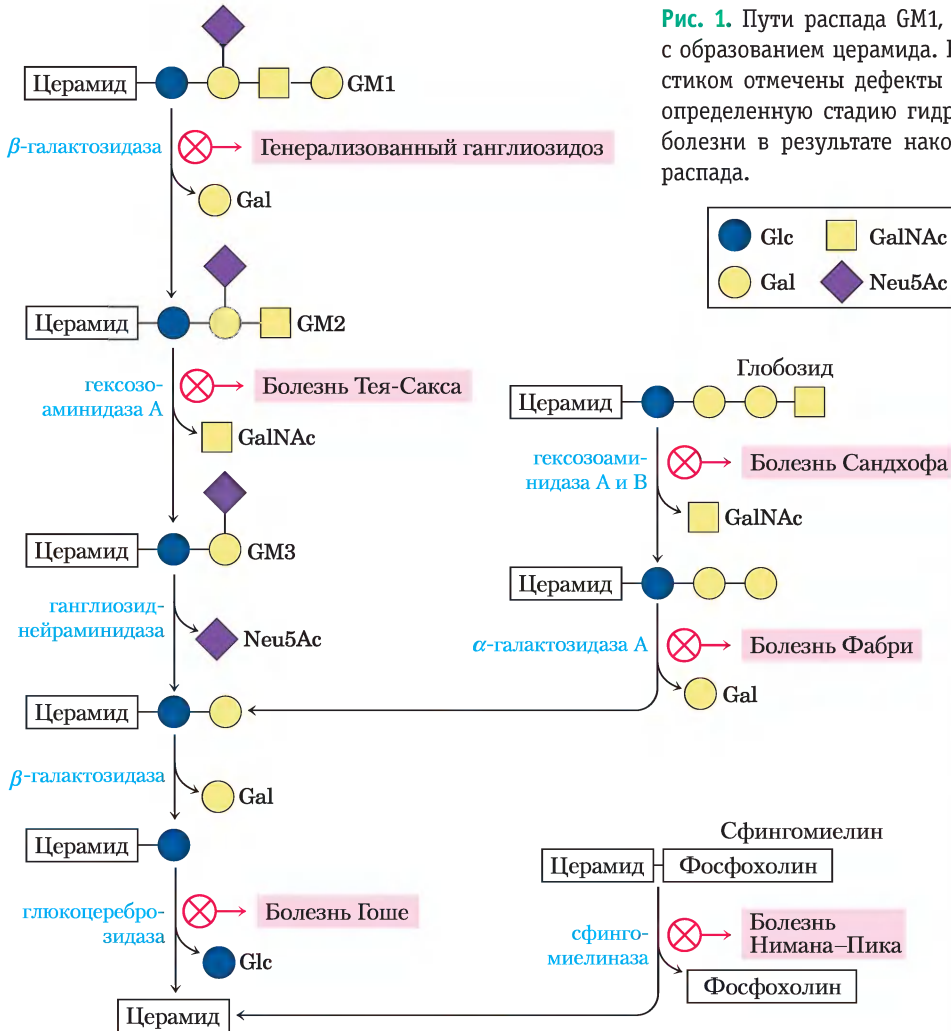


Рис. 1. Пути распада GM1, глобозид и сфингомиелина с образованием церамида. Красными кружочками с крестиком отмечены дефекты фермента, осуществляющего определенную стадию гидролиза, рядом дано название болезни в результате накопления продукта неполного распада.

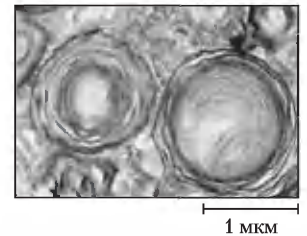
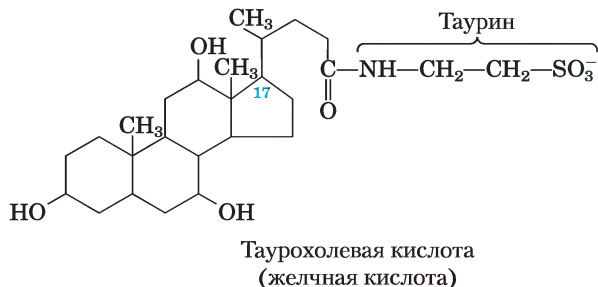


Рис. 2. Электронная микрофотография части клетки головного мозга ребенка с болезнью Тея–Сакса демонстрирует аномальные отложения ганглиозид в лизосомах.

Мы вернемся к холестерину и другим стеринам в последующих главах, чтобы рассмотреть структурную роль холестерина в биологических мембранах (гл. 11), передачу сигналов стероидными гормонами (гл. 12) и поразительный путь биосинтеза холестерина и его транспорт посредством липопротеиновых переносчиков (гл. 21).



Краткое содержание раздела 10.2 СТРУКТУРНЫЕ ЛИПИДЫ В МЕМБРАНАХ

- Полярные липиды с полярными «головками» и неполярными «хвостами» — главные компоненты мембран. К наиболее распространенным относятся глицерофосфолипиды, которые содержат жирные кислоты, образующие сложноэфирную связь с двумя гидроксильными группами глицерина, и второй спирт (полярная «головка»), связанный с третьим гидроксилом глицерина фосфодиэфирной связью. Другими полярными липидами являются стерины.
- Глицерофосфолипиды различаются по структуре их полярной «головки»; наиболее часто встречающимися фосфолипидами являются фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин. При pH, близком к 7, полярные «головки» глицерофосфолипидов несут заряд.
- Мембраны хлоропластов чрезвычайно богаты галактолипидами, состоящими из диацилглицерина, связанного с одним или двумя остатками галактозы, и сульфолипидами — диацилглицеринами с присоединенным сульфонируемым остатком сахара, благодаря которому они имеют отрицательно заряженную «головку».

■ Археи содержат уникальные мембранные липиды с длинноцепочечными алкильными группами, связанными простой эфирной связью с глицерином на обоих концах и с остатками сахара и/или фосфата, присоединенными к глицерину, образуя полярную или заряженную «головку». Эти липиды стабильны в жестких условиях, при которых существуют археи.

■ Сфинголипиды содержат не глицерин, а сфингозин — длинноцепочечный алифатический аминоспирт. Помимо фосфорной кислоты и холина, сфингомиелин содержит две длинные углеводородные цепи, одна из них происходит из жирной кислоты, другая — из сфингозина. Три других класса сфинголипидов — это цереброзиды, глобозиды и ганглиозиды, которые в своем составе содержат сахар.

■ Стерины несут четыре конденсированных кольца и гидроксильную группу. Холестерин, основной стерин животных, является и структурным компонентом мембран, и предшественником разнообразных стероидов.

10.3. Липиды как сигнальные вещества, кофакторы и пигменты

Два функциональных класса липидов, которые мы до сих пор рассматривали (запасные и структурные липиды), являются главными клеточными компонентами; мембранные липиды составляют от 5 до 10% сухой массы большинства клеток, а депонированные липиды — более чем 80% массы адипоцита. За некоторыми исключениями эти липиды играют *пассивную* роль в клетке; липидное топливо сохраняется до тех пор, пока не окислится ферментами, а мембранные липиды образуют непроницаемые барьеры вокруг клеток и клеточных компартментов. Липиды другого класса присутствуют в гораздо меньших количествах, но играют *активную* роль в обмене веществ в качестве метаболитов и мессенджеров. Некоторые из них работают как мощные сигнальные вещества, например как гормоны, переносимые кровью из одной ткани в другую, или как внутриклеточные посредники (мессенджеры), генерируемые в от-

вет на внеклеточный сигнал (гормон или фактор роста). Другие функционируют как кофакторы ферментов в реакциях с переносом электронов в хлоропластах и митохондриях или при переносе остатков сахара в множестве реакций гликозилирования (присоединения сахара). Третью группу составляют липиды с системой сопряженных двойных связей: это пигментные молекулы, которые поглощают видимый свет. Некоторые из них действуют как светопоглощающие пигменты в процессах зрения и фотосинтеза; другие обеспечивают окраску, например оранжевый цвет тыквы и моркови и желтый цвет перьев канарейки. Наконец, большая группа летучих липидов синтезируется растениями в качестве сигналов, распространяемых по воздуху, которые позволяют растениям общаться друг с другом, привлекать дружелюбно настроенных животных и отпугивать врагов. В этом разделе мы опишем несколько таких биологически активных липидов. В последующих главах их синтез и биологическая роль рассмотрены более подробно.

Фосфатидилинозиты и производные сфингозина работают как внутриклеточные сигналы


Фосфатидилинозит и его фосфорилированные производные участвуют в нескольких уровнях регуляции клеточной структуры и метаболизма. Фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат (рис. 10-9) на цитоплазматической (внутренней) поверхности плазматической мембраны является запасной формой молекул-посредников, высвобождающихся внутрь клетки в ответ на внеклеточные сигналы, действующие на специфические рецепторы, расположенные на внешней поверхности плазматической мембраны. Внеклеточные сигналы, такие как гормон вазопрессин, активируют фосфолипазу C в мембране. Она гидролизует фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат, высвобождая два продукта, которые действуют как внутриклеточные мессенджеры, — инозит-1,4,5-трисфосфат (IP_3), растворимый в воде, и диацилглицерин, остающийся в связанном с плазматической мембраной виде. Молекула IP_3 инициирует выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулула, а комбинация диацилглицерина и увеличенной концентрации Ca^{2+} в цитозоле активирует фермент протеинкиназу C. Этот

фермент фосфорилирует специфические белки, что вызывает клеточный ответ на внеклеточный сигнал. Такой сигнальный механизм более подробно описан в гл. 12 (см. рис. 12-10).

Инозитные фосфолипиды также служат в качестве «зародышей» для образования некоторых надмолекулярных комплексов, участвующих в передаче сигналов или в экзоцитозе. Специальные сигнальные белки специфически связываются с фосфатидилинозит-3,4,5-трисфосфатом в плазматической мембране, инициируя образование мультиферментных комплексов на обращенной в цитозоль поверхности мембраны. Образование фосфатидилинозит-3,4,5-трисфосфата в ответ на внеклеточные сигналы удерживает белки вместе в сигнальных комплексах на поверхности плазматической мембраны (см. рис. 12-16).

Мембранные сфинголипиды могут также служить источником внутриклеточных мессенджеров. И церамид, и сфингомиелин (рис. 10-13) — мощные регуляторы протеинкиназ; известно, что церамид или его производные участвуют в регуляции клеточного деления, дифференцировки, миграции и программируемой клеточной гибели (апоптоза; см. гл. 12).

Эйкозаноиды передают сигналы соседним клеткам

 Эйкозаноиды — паракринные гормоны, которые действуют только на клетки вблизи места синтеза гормона; они не транспортируются кровью и не действуют на клетки других тканей или органов. Эти производные жирных кислот оказывают разнообразные сильные эффекты на ткани позвоночных. Известно, что они участвуют в репродуктивной функции; в воспалении, лихорадке и боли, которые связаны с повреждением или болезнью; в образовании кровяных сгустков и в регуляции кровяного давления; в секреции кислоты в желудке и во множестве других процессов как у здорового человека, так при ряде заболеваний.

Все эйкозаноиды — производные арахидоновой кислоты (20:4($\Delta^{5,8,11,14}$)) (рис. 10-18), 20-углеродной полиненасыщенной жирной кислоты, от которой они и получили свое общее название (от греч. *eikosi* — двадцать). Существует три класса эйкозаноидов: простагландины, тромбоксаны и лейкотриены.

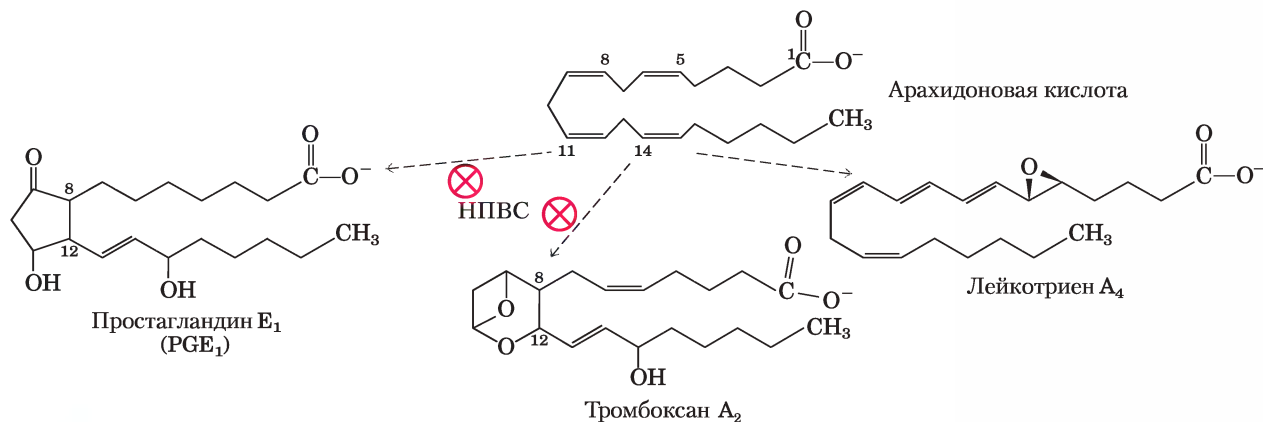


Рис. 10-18. Арахидоновая кислота и некоторые эйкозаноиды.

Арахидоновая кислота (арахидонат-ион при pH 7) — предшественник эйкозаноидов, включая простагландины, тромбоксаны и лейкотриены. В простагландине E₁ C-8 и C-12 арахидонат-иона соединены, образуя характерное пятичленное кольцо. В тромбоксане A₂ соединены C-8 и C-12, а еще присутствует атом кислорода, так что образуется шестичленное кольцо. Лейкотриен A₄ имеет три сопряженные двойные связи. Нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (НПВС), такие как аспирин и ибупрофен, блокируют образование простагландинов и тромбоксанов из арахидонат-иона, ингибируя фермент циклооксигеназу (простагландин-H₂-синтазу).



Джон Вейн, Суне Бергстрём и Бенгт Самуэльсон


Простагландины (PG) содержат пятичленное кольцо, образованное из арахидоновой кислоты. Их название происходит от предстательной железы (простаты), из которой они впервые были выделены Бенгтом Самуэльсоном и Суне Бергстрёмом. Первоначально были определены две группы простагландинов: PGE — растворимые в эфире (англ. *ether*) и PGF — растворимые в фосфатном (швед. *fosfat*) буфере. Каждая группа содержит многочисленные подтипы, называемые PGF₁, PGF₂ и т. д. Простагландины выполняют множество функций. Некоторые из них стимулируют сокращение гладкой мускулатуры матки при менструации и родах. Другие влияют на кровоснабжение отдельных органов, на цикл сна и бодрствования, на чувствительность ряда тканей к таким гормонам, как адреналин и глюкагон. Простагландины третьей группы повышают температуру тела, приводя к лихорадочному состоянию, вызывают воспаление и боль.

Тромбоксаны имеют шестичленное кольцо, содержащее эфирную связь. Они производятся тромбоцитами и участвуют в формировании

кровенных сгустков и в уменьшении кровотока к участку образования сгустка. Как было показано Джоном Вейном, НПВС, например аспирин, ибупрофен и напроксен, ингибируют фермент простагландин-H₂-синтазу (циклооксигеназа, COX), который катализирует раннюю стадию превращения арахидонат-иона в простагландины и тромбоксаны (рис. 10-18, см. также рис. 21-15).

Лейкотриены, впервые найденные в лейкоцитах, содержат три сопряженные двойные связи. Это мощные биологически активные сигнальные вещества. Например, лейкотриен D₄, производное лейкотриена A₄, вызывает сокращение мышцы, выстилающей дыхательные пути к легкому. Избыточная продукция лейкотриенов вызывает астматический спазм, поэтому синтез лейкотриенов является одной из мишеней антиастматических средств, таких как преднизон. Сильное сокращение гладких мышц легких, которое происходит при анафилактическом шоке, у больных аллергией (сверхчувствительных к пчелиным укусам, пенициллину или другим веществам) может иметь смертельный исход. ■

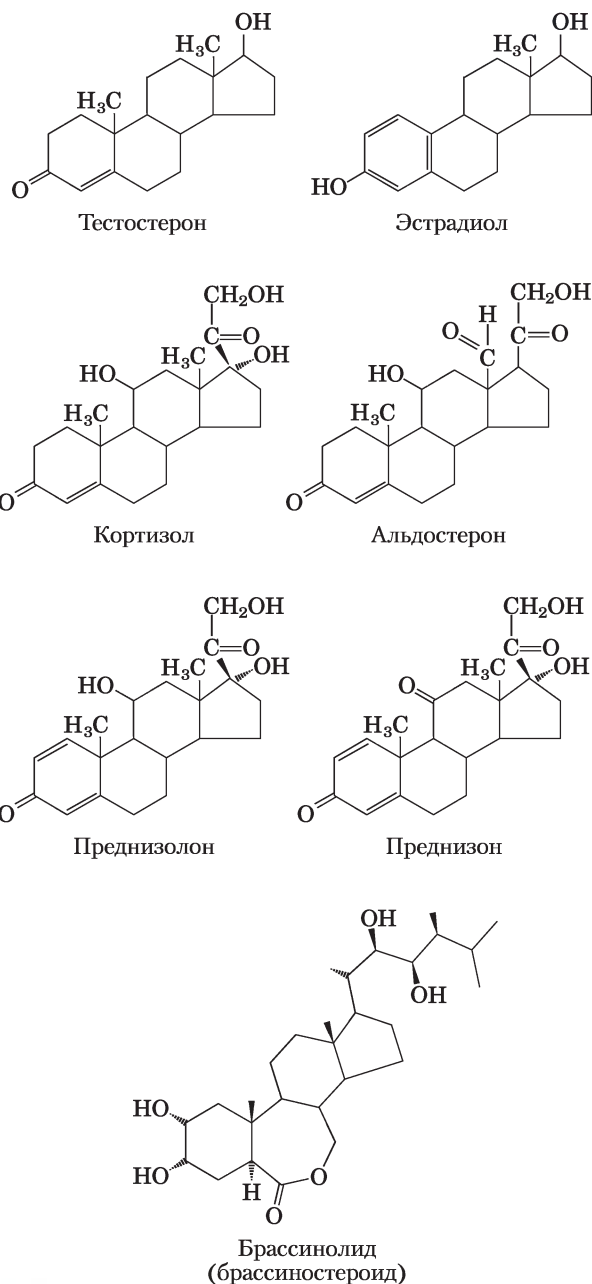
Стероидные гормоны передают сигналы между тканями


 Стероиды — это окисленные производные стерина; они имеют стеринное ядро, но в них отсутствует алкильная цепочка, связанная с кольцом D холестерина, поэтому они более полярны, чем холестерин. Стероидные гормоны переносятся кровотоком (на белках-переносчиках) от места их образования к тканям-мишеням, где они проникают в клетки, связываются с высокоспецифическими рецепторными белками в ядре и инициируют изменения в экспрессии генов и метаболизме. Поскольку гормоны имеют очень высокое сродство к своим рецепторам, малых концентраций гормонов (наномолярных или меньше) достаточно, чтобы вызвать ответные реакции в тканях-мишенях. Главную группу стероидных гормонов составляют мужские и женские половые гормоны и гормоны кортизол и альдостерон, производимые корой надпочечников (рис. 10-19). Преднизон и преднизолон являются стероидными лекарственными препаратами с сильным противовоспалительным действием, которое отчасти связано с ингибированием высвобождения арахидонат-иона фосфолипазой A₂ (рис. 10-18) и проистекающим отсюда ингибированием синтеза лейкотриенов, простагландинов и тромбоксанов. Они широко применяются в медицине, в том числе для лечения астмы и ревматоидного артрита. ■

Сосудистые растения содержат похожее на стероиды вещество брассинолид (рис. 10-19) — мощный регулятор роста, увеличивающий скорость удлинения стебля и влияющий на ориентацию микрофибрил целлюлозы в клеточной стенке в процессе роста.

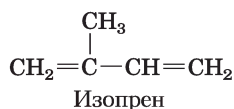
Сосудистые растения используют тысячи летучих сигнальных веществ

Растения синтезируют тысячи различных липофильных летучих соединений, которые служат для привлечения опылителей, защиты от травоядных животных, привлекают организмы, защищающие растения от травоядных животных или служат средствами связи с другими растениями. Жасмонат, происходящий от жирной кислоты 18:3($\Delta^9, 12, 15$) в мембранных липидах, химически сходен с эйкозаноидами животных тканей; он служит мощным сигнальным веществом, активирующим защиту



 **Рис. 10-19.** Стероиды — производные холестерина. Тестостерон, мужской половой гормон, вырабатывается в яичках. Эстрадиол, один из женских половых гормонов, вырабатывается в яичниках и плаценте. Кортизол и альдостерон — гормоны, синтезирующиеся в коре надпочечников; они регулируют метаболизм глюкозы и выведение солей. Преднизолон и преднизон — синтетические стероиды, применяемые как противовоспалительные лекарственные средства. Брассинолид — регулятор роста, обнаруженный в сосудистых растениях.

растения в ответ на нанесенное насекомыми повреждение. Метилловый эфир жасмоната обладает характерным ароматом жасминового масла, которое широко используется в парфюмерии. Многие из летучих соединений, синтезируемых растениями, являются производными жирных кислот или соединений, образующихся в результате конденсации пятиуглеродных изопреновых звеньев. Среди этих соединений можно назвать гераниол (характерный запах герани), β -пинен (сосна), лимонен (лайм), ментол, карвон (см. рис. 1-23, а).



Витамины А и D — предшественники гормонов

В первой трети XX в. главной целью исследований в области физиологической химии была идентификация **витаминов** — соединений,

которые необходимы для здоровья человека и других позвоночных, но не могут синтезироваться этими животными и, следовательно, должны быть получены с пищей. В ранних исследованиях в области питания были выявлены два главных класса таких соединений: растворимые в неполярных органических растворителях жирорастворимые витамины и водорастворимые витамины, которые можно экстрагировать из продуктов питания водными растворителями. Среди жирорастворимых витаминов — витамины А, D, Е и К. Все они изопреноидные соединения, синтезирующиеся путем многократной конденсации изопреновых единиц. Витамины D и А выполняют роль предшественников гормонов.

Витамин D₃, или **холекальциферол**, обычно образуется в коже из 7-дегидрохолестерина в фотохимической реакции, запускаемой ультрафиолетовой (УФ) составляющей солнечного света (рис. 10-20, а). Витамин D₃ сам по себе не обладает биологической активностью, но пре-



Рис. 10-20. Образование и метаболизм витамина D₃. а) Холекальциферол (витамин D₃) вырабатывается в коже при УФ-облучении 7-дегидрохолестерина, приводящем к разрушению связи (показана розовым цветом). В печени к С-25 добавляется гидроксильная группа (розовый цвет); в почке второе гидроксильное по С-1 (розовый цвет) дает активный гормон 1,25-дигидроксихолекальциферол. Этот гормон регулирует метаболизм Ca²⁺ в почках, кишечнике и скелете. б) Поступающий с пищей витамин D предотвращает рахит — болезнь, когда-то распространенную в местах с холодным климатом, где тяжелая толстая одежда не пропускает УФ-компонент солнечного света, необходимый для производства витамина D₃ в коже. Здесь представлен фрагмент фрески «О пользе биохимических исследований», выполненной Джоном Стюартом Карри в 1943 г. на одной из стен в здании биохимического факультета университета Висконсин-Мэдисон, США. Люди и животные, изображенные слева, демонстрируют результат недостаточного питания (обратите внимание на кривые ноги рахитичного мальчика). Справа изображены люди и животные, ставшие здоровыми благодаря результатам научных исследований, включая использование витамина D для предотвращения и лечения рахита.

вращается ферментами печени и почек в 1,25-дигидроксиголекальциферол, гормон, который регулирует всасывание кальция в кишечнике и уровень кальция в почках и костях. Недостаток витамина D вызывает неправильное формирование скелета и рахит, при котором прием витамина D приводит к быстрому исцелению (рис. 10-20, б). Витамин D₂ (эргокальциферол) производится фармакологическими компаниями при УФ-облучении эргостерина дрожжей. Витамин D₂ по структуре аналогичен D₃, отличается только боковая цепь в D-кольце стерина. Оба соединения оказывают одинаковые биологические эффекты, и D₂ обычно добавляют в молоко и масло в ка-

честве пищевой добавки. Подобно стероидным гормонам, продукт метаболизма витамина D 1,25-дигидроксиголекальциферол регулирует экспрессию генов, взаимодействуя с белками-рецепторами в ядре (см. разд. 28.3).

Витамин А (ретинол) в разнообразных формах функционирует как зрительный пигмент глаза позвоночных (рис. 10-21). Действуя через рецепторные белки в клеточном ядре, производное витамина А ретиноевая кислота регулирует экспрессию генов при развитии эпителиальной ткани, в том числе кожи. Ретиноевая кислота является активной частью в лекарстве третиноине (Retin-A), применяемом при лечении угревой

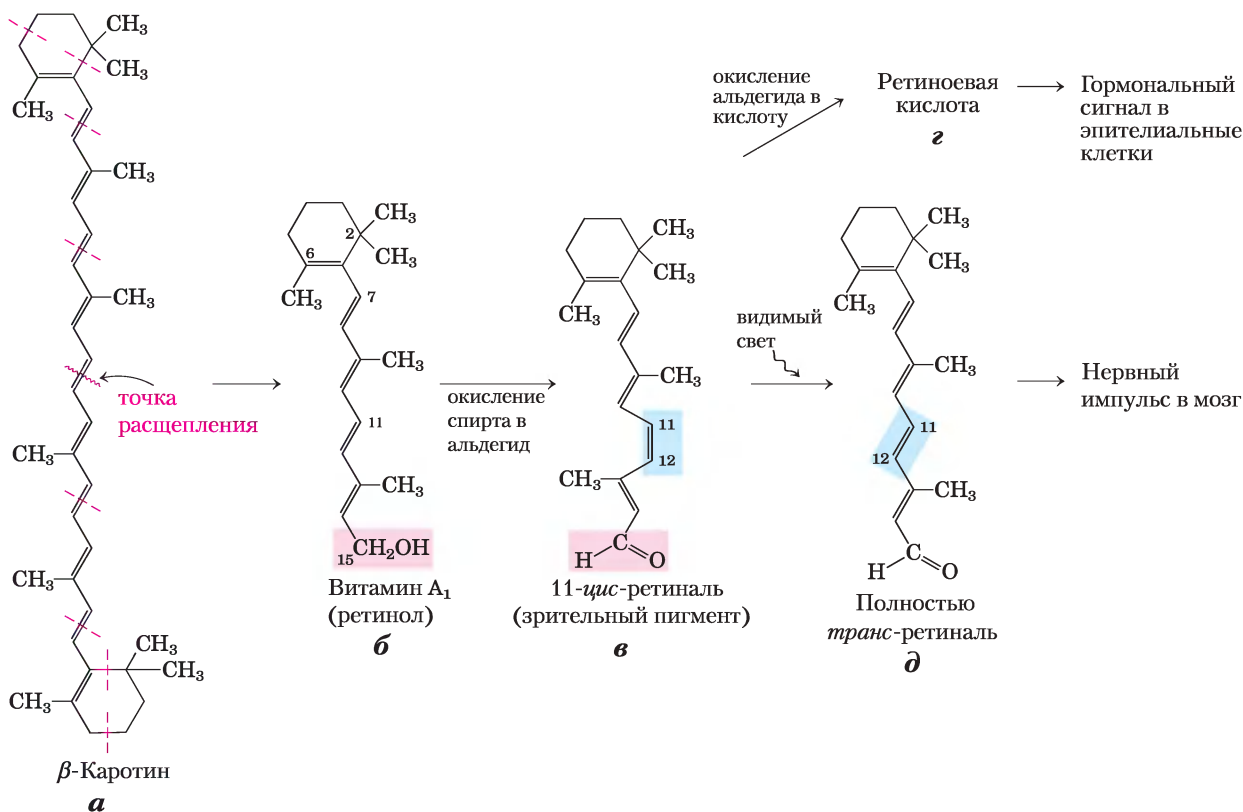


Рис. 10-21. Витамин А₁, его предшественник и производные. а) β -Каротин — предшественник витамина А₁. Изопrenoвые структурные единицы выделены красными пунктирными линиями. Расщепление β -каротина дает две молекулы витамина А₁ (ретинола). б) Окисление у С-15 превращает ретинол в альдегид ретиаль (в), а дальнейшее окисление приводит к ретиноевой кислоте (г) — гормону, регулирующему экспрессию генов. Ретиаль соединяется с белком опсином, образуя родопсин (на рисунке не показано), зрительный пигмент. В темноте ретиаль родопсина находится в 11-цис-форме (в). Когда молекула родопсина возбуждается видимым светом, 11-цис-ретиаль подвергается серии фотохимических реакций, которые превращают его в полностью транс-ретиаль (д), что вынуждает всю молекулу родопсина изменить свою форму. Такая трансформация палочек сетчатки позвоночных посылает электрический сигнал в мозг. Это и является основой зрительной трансдукции (передачи сигнала). Эту тему более детально мы обсудим в гл. 12.

сыпи и морщинистой кожи. Еще одно производное витамина А, ретиналь, — пигмент, который инициирует ответ зрительных клеток сетчатки — палочек и колбочек — на действие света, передавая нервный импульс в мозг. Эта роль ретиналя подробно описана в гл. 12.

Витамин А впервые был выделен из рыбьего жира; печень, яйца, цельное молоко — прекрасные пищевые источники витамина А. У позвоночных β -каротин — пигмент, который придает моркови, сладкому картофелю и другим желтым овощам их характерный цвет, может ферментативно превращаться в витамин А. Недостаток витамина А приводит к возникновению у человека разнообразных симптомов, включая сухость кожи, глаз и слизистых оболочек, замедление развития и роста, а также «куруную слепоту» — симптом для ранней диагностики дефицита витамина А. ■

Витамины Е и К и липидные хиноны — окислительно-восстановительные кофакторы

Витамин Е — общее название группы близкородственных липидов **токоферолов**, которые содержат замещенное ароматическое кольцо и длинную изопреноидную боковую цепочку (рис. 10-22, а). Токоферолы гидрофобны, они ассоциированы с клеточными мембранами, липидными отложениями и липопротеинами крови. Токоферолы являются биологическими антиоксидантами. Ароматическое кольцо реагирует с наиболее активными формами кислородных и других свободных радикалов, разрушает их, защищая таким образом ненасыщенные жирные кислоты от окисления и предотвращая окислительное повреждение мембранных липидов, которое может привести к гибели клетки. Токо-

феролы обнаружены в яйцах и в растительных маслах, а особенно ими богаты зародыши пшеницы. У лабораторных животных, получавших пищу, лишенную витамина Е, наблюдалась чешуйчатость кожи, мышечная слабость, истощение и бесплодие. Дефицит витамина Е у человека наблюдается очень редко; основным симптомом являются короткоживущие эритроциты.

Ароматическое кольцо **витамина К** (рис. 10-22, б) проходит цикл окисления–восстановления при образовании активного протромбина — белка плазмы крови, необходимого для формирования кровяного сгустка. Протромбин — протеолитический фермент, расщепляющий пептидные связи в белке крови фибриногене с превращением последнего в фибрин — нерастворимый фибриллярный белок, удерживающий вместе кровяные сгустки. Хенрик Дам и Эдвард А. Дойси независимо друг от друга обнаружили, что дефицит витамина К замедляет свертывание крови, и это может быть опасно для жизни. Дефицит витамина К встречается у людей в очень редких случаях; эта патология бывает у небольшого числа младенцев, страдающих геморрагической болезнью новорожденных, потенциально смертельным недугом. В США всем новорожденным вводят 1 мг витамина К. Витамин K_1 (филлохинон) обнаружен в зеленых листьях растений; родственная форма — витамин K_2 (менахинон) — синтезируется бактериями, населяющими кишечник позвоночных.

Варфарин (рис. 10-22, в) — это синтетическое соединение, которое ингибирует образование активного протромбина. Применяется как эффективный яд для крыс — вызывает их гибель в результате внутреннего кровотечения. По иронии судьбы это мощное средство для уничтожения грызунов в то же время является очень важным антикоагулянтом — лекарством для лечения людей с риском увеличенного свертывания крови, например при хирургических операциях, и больных с коронарным тромбозом. ■

Убихинон (называемый также коэнзимом Q) и пластохинон (рис. 10-22, г, д) — изопреноиды, которые функционируют как липофильные переносчики электронов в окислительно-восстановительных реакциях при синтезе АТФ в митохондриях и хлоропластах. И убихинон, и пластохинон могут принимать один или два электрона и один или два протона (рис. 19-2).



Эдвард А. Дойси, 1893–1986



Хенрик Дам, 1895–1976

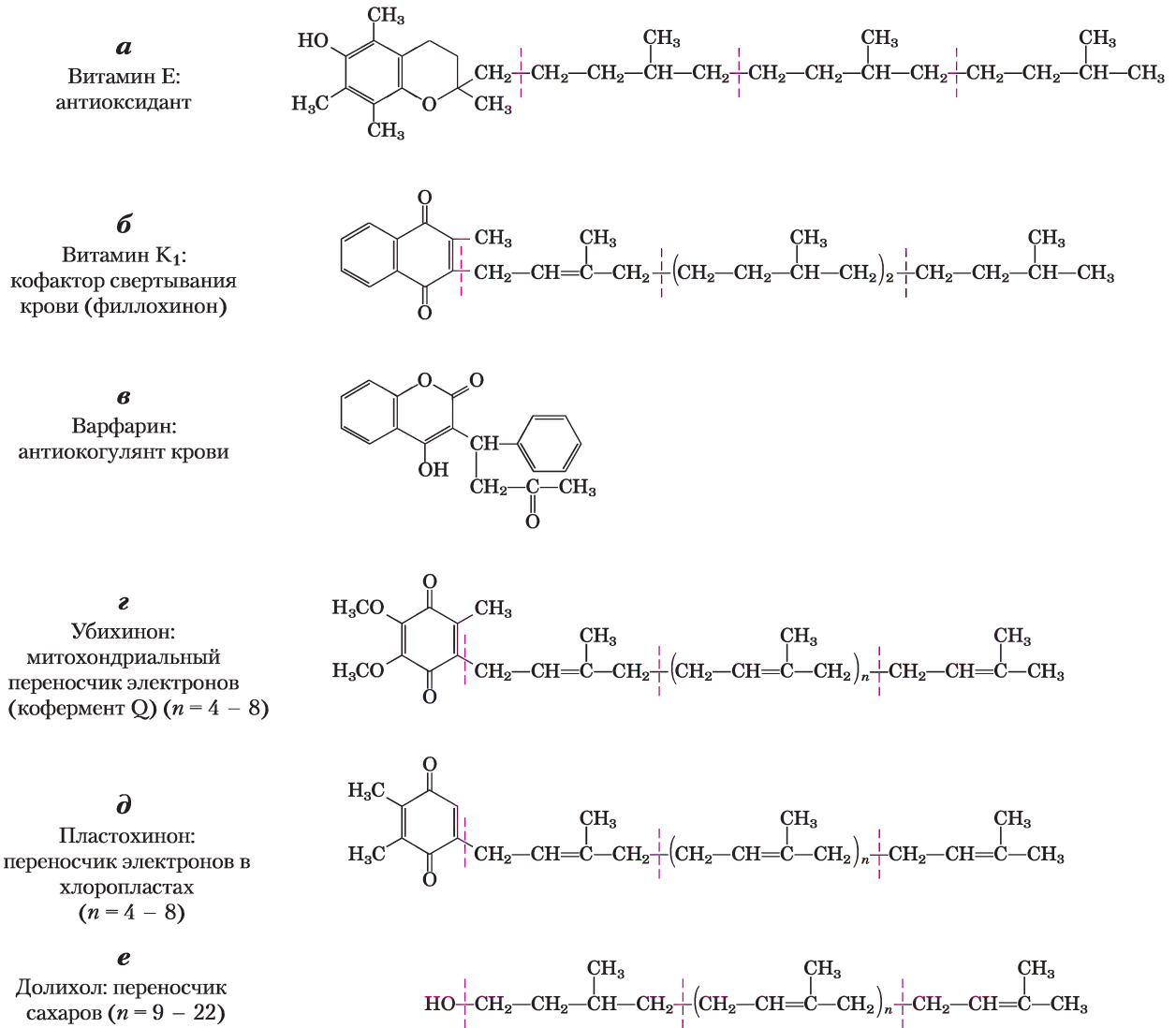


Рис. 10-22. Некоторые биологически активные изопреноидные соединения. Изопреновые структурные единицы выделены пунктирными красными линиями. В большинстве тканей млекопитающих убихинон (коэнзим Q) имеет 10 изопреновых единиц. Долихолы животных содержат от 10 до 17 изопреновых единиц (от 85 до 105 атомов углерода), бактериальные долихолы — 11, а долихолы растений и грибов — от 14 до 24 единиц.

Долихолы активируют предшественников сахаров для биосинтеза

В процессе сборки комплекса углеводов бактериальной клеточной стенки и в процессе присоединения полисахаридных единиц к некоторым белкам (гликопротеины) и липидам (гликоли-

пиды) у эукариот, присоединяемые сахарные остатки химически активируются при связывании с изопреноидными спиртами **долихолами** (рис. 10-22, е). Эти соединения вступают в сильные гидрофобные взаимодействия с мембраной, закоривая в ней присоединенные сахара, где последние участвуют в реакциях переноса сахаров.

Многие природные пигменты — липиды с сопряженными двойными связями

В углеродной цепи сопряженных диенов одинарные связи чередуются с двойными связями. В такой структуре легко происходит делокализация электронов, поэтому эти соединения переходят в возбужденное состояние под действием электромагнитного излучения с низким уровнем энергии (видимый свет), что делает их видимыми для людей и животных. Каротин (рис. 10-21) имеет желто-оранжевую окраску. Сходные соединения делают оперение птиц ярко оранжевым, красным и желтым (рис. 10-23). Подобно стеролам, стероидам, долихолам, витаминам А, Е, D и К, убихинону и пластохинону, эти пигменты синтезируются из пятиуглеродных производных изопрена. Этот путь биосинтеза подробно описан в гл. 21.

Краткое содержание раздела 10.3 ЛИПИДЫ КАК СИГНАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА, КОФАКТОРЫ И ПИГМЕНТЫ

- Некоторые типы липидов, хотя и присутствующие в относительно малых количествах, играют решающую роль в качестве кофакторов или сигнальных молекул.

- Фосфатидилинозитбисфосфат гидролизуется с образованием двух внутриклеточных мессенджеров, диацилглицерина и инозит-1,4,5-трисфосфата. Фосфатидилинозит-3,4,5-трисфосфат — «затравка» для образования надмолекулярных белковых комплексов, участвующих в передаче биологических сигналов.
- Простагландины, тромбоксаны и лейкотриены (эйкозаноиды), происходящие из арахидоновой кислоты, — чрезвычайно сильные гормоны.
- Стероидные гормоны, происходящие из стероидов, служат мощными биологическими сигнальными веществами (например, половые гормоны).
- Витамины D, А, Е и К — жирорастворимые соединения, построенные из изопреновых единиц. Все они играют важнейшую роль в метаболизме и физиологии животных. Витамин D — предшественник гормона, регулирующего обмен кальция. Витамин А поставляет зрительный пигмент глаза позвоночных и является регулятором экспрессии генов в процессе роста эпителиальных клеток. Витамин Е защищает мембранные липиды от окисли-

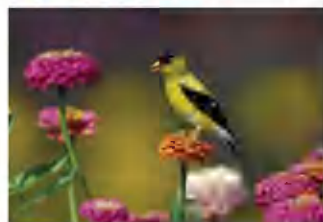
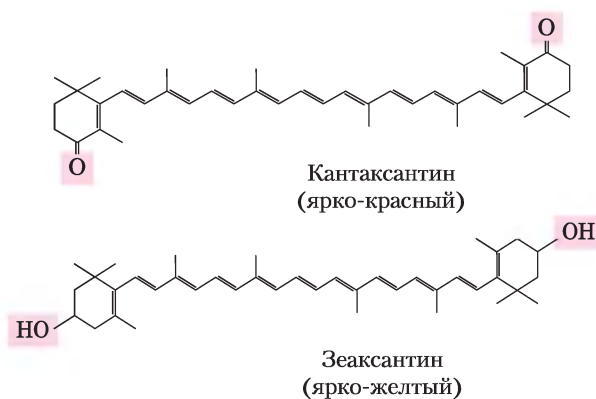


Рис. 10-23. Липиды в качестве пигментов в растениях и в птичьем оперении. Соединения с протяженными системами сопряженных связей поглощают свет в видимой области спектра. Именно эти вещества, несколько различающиеся по структуре, являются природными пигментами удивительно ярких и разнообразных цветов. Оперение птиц приобретает красную или желтую окраску, если птицы употребляют в пищу растения, содержащие пигменты каротиноиды, такие как кантаксантин и зеаксантин. Различие окраски самцов и самок у птиц объясняется различиями в усвояемости и метаболизме каротиноидов.

тельного повреждения, и, наконец, витамин К необходим для процесса свертывания крови.

- Убихиноны и пластохиноны, а также изопреноидные соединения работают переносчиками электронов в митохондриях и хлоропластах соответственно.
- Долихолы активируют и заякоривают сахара на клеточных мембранах для использования в синтезе некоторых сложных углеводов, гликолипидов и гликопротеинов.
- Липиды со структурой сопряженных диенов играют роль пигментов в цветах и фруктах и именно они обеспечивают яркую окраску оперения птиц.

10.4. Методы анализа липидов

Поскольку липиды нерастворимы в воде, их экстракция и последующее разделение требуют использования органических растворителей и некоторых методик, которые не применяются при очистке водорастворимых веществ, таких как белки или углеводы. Общий подход к разделению сложных смесей липидов основан на различиях в их полярности или растворимости в неполярных растворителях. Для последующего анализа липиды, которые содержат жирные кислоты, связанные сложноэфирной или амидной связью, можно гидролизовать, обработав кислотой, щелочью или высокоспецифичными гидролитическими ферментами (фосфолипазы, гликозидазы). Некоторые методы, широко применяемые для анализа липидов, представлены на **рис. 10-24** и обсуждаются ниже.

Для экстракции липидов требуются органические растворители

Нейтральные липиды (триацилглицериды, воски, пигменты и др.) легко экстрагируются из тканей в этиловый эфир, хлороформ или бензол. Эти растворители не допускают ассоциации липидов, обусловленной их гидрофобными свойствами. Мембранные липиды эффективнее экстрагируются более полярными растворителями, такими как этанол или метанол, которые уменьшают гидрофобные взаимодействия между липидными

молекулами, ослабляя водородные связи и электростатические взаимодействия между ними и мембранными белками. Часто применяется смешанный экстракционный растворитель хлороформ–метанол–вода в соотношении 1 : 2 : 0,8 (это гомогенная смесь). При экстракции липидов готовят гомогенат ткани в растворителе, к полученному экстракту добавляют некоторое количество воды, и смесь расслаивается на две фазы — водно-метанольный слой (вверху) и слой хлороформа (внизу). Липиды остаются в хлороформенном слое, а более полярные молекулы, такие как белки и сахара, попадают в водно-метанольный слой.

Методом адсорбционной хроматографии разделяют липиды разной полярности

Сложные смеси тканевых липидов разделяют на фракции, используя хроматографические методы (рис. 10-21, б). В методе адсорбционной хроматографии разделение проводят на стеклянных колонках с нерастворимым полярным адсорбентом, таким как силикагель (в зависимости от количества воды можно аппроксимировать разными формулами, в пределе это кремневая кислота $\text{Si}(\text{OH})_4$). В верхнюю часть колонки вводят хлороформенный экстракт смеси липидов. (В методе высокоэффективной жидкостной хроматографии, сокращенно ВЭЖХ, применяются колонки меньшего диаметра и раствор, а добавляемый растворитель продавливается через колонку под высоким давлением.) Полярные липиды прочно связываются с полярной кремневой кислотой, нейтральные же липиды проходят через колонку и выходят с первыми порциями элюата. Затем вымываются полярные липиды, они выходят в порядке увеличения полярности при промывании колонки растворителями с постепенно возрастающей полярностью. Незаряженные, но полярные липиды (например, цереброзиды) вымываются ацетоном, а очень полярные или заряженные липиды (такие как глицерофосфолипиды) элюируются метанолом.

В методе тонкослойной хроматографии на силикагеле заложен тот же принцип (рис. 10-24, в). Тонкий слой силикагеля распределен по стеклянной пластинке, к которой он прилипает. Небольшое количество липидов, растворенных в хлороформе, наносят близко к краю пластинки, которую погружают в плоский контейнер с органическим

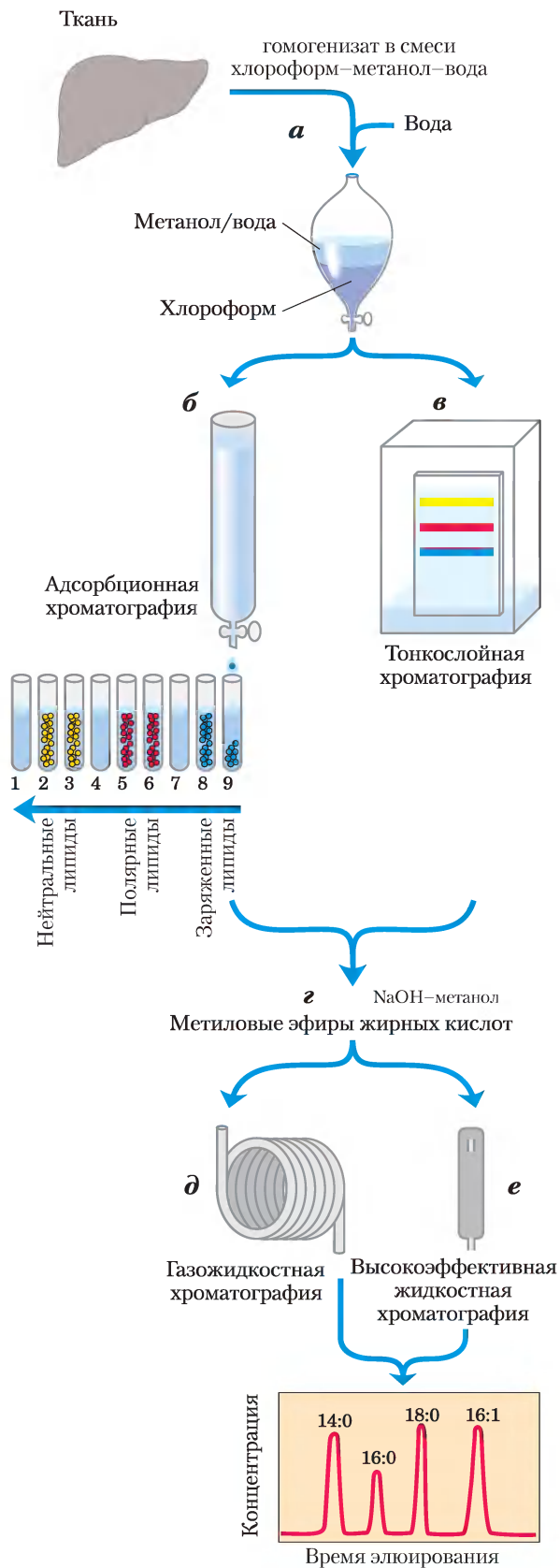


Рис. 10-24. Обычные процедуры при экстракции, разделении и идентификации клеточных липидов. а) Ткань гомогенизируют в смеси хлороформ-метанол-вода. После добавления воды и удаления неэкстрагируемого осадка центрифугированием получают две фазы. Различные типы экстрагированных липидов в хлороформенной фазе могут быть разделены адсорбционной хроматографией (б) на колонке из силикагеля, через которую пропускаются растворители с увеличивающейся полярностью, или (в) с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), когда липиды переносятся восходящим фронтом растворителя вверх по пластинке, покрытой силикагелем, при этом менее полярные липиды проходят дальше, чем более полярные или заряженные. При использовании подходящих растворителей ТСХ можно применить для разделения родственных липидов; например, заряженные липиды фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и фосфатидилинозит легко разделяются методом ТСХ.

Для определения состава жирных кислот липидная фракция, содержащая связанные сложноэфирной связью жирные кислоты, переэтерифицируется в горячем водном растворе NaOH и метанола (г) для получения смеси метиловых эфиров жирных кислот. Эти метиловые эфиры затем разделяют по длине углеродной цепочки и степени ненасыщенности методом (д) газожидкостной хроматографии (ГЖХ) или методом (е) высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Определение молекулярной массы с помощью масс-спектрометра делает возможным однозначно идентифицировать индивидуальные липиды.

растворителем или смесью растворителей. Все это находится внутри камеры, насыщенной парами растворителя. Поднимаясь по пластинке вследствие капиллярного эффекта, растворитель несет с собой липиды. Менее полярные липиды продвигаются дальше, так как они проявляют меньшее сродство к кремниевой кислоте. Разделенные липиды можно обнаружить, опрыскивая пластинку красителем (родамином), который флуоресцирует при связывании с липидами, или выдерживая липиды в парах иода. Иод обратимо реагирует с двойными связями в жирных кислотах, так что липиды, содержащие ненасыщенные жирные кислоты, дают желтые или коричневые полосы на пластинке. Для обнаружения некоторых липидов надо использовать ряд других реагентов. Для последующего анализа участки, содержащие разделенные липиды, снимают с пластинки шпателем, и липиды из геля экстрагируют органическим растворителем.

Методом газожидкостной хроматографии разделяют смеси летучих производных липидов

Метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) используют при разделении газов. Образец наносят в капиллярную колонку, обработанную инертной жидкостью, разделение проводят в потоке инертного газа, например гелия. Этим методом можно непосредственно разделять летучие липиды; однако чаще встречаются липиды с недостаточно легко кипящие, поэтому предварительно эти вещества требуется перевести в более летучие производные (соединения, температура кипения которых ниже). Для определения жирных кислот образец фосфолипидов сначала нагревают в смеси метанол–HCl или метанол–NaOH, при этом жирные кислоты, связанные сложноэфирной связью с глицерином, превращаются в метиловые эфиры (происходит переэтерификация; рис. 10-24, з). Затем эти метиловые эфиры жирных кислот наносят на ГЖХ-колонку, колонку нагревают, чтобы сделать определяемые компоненты летучими. Эфиры жирных кислот, которые лучше растворяются в материале, наполняющем колонку, переходят в раствор; менее растворимые липиды уносятся потоком инертного газа и первыми выходят из колонки. Порядок элюирования зависит от природы твердого адсорбента в колонке и от температуры кипения компонентов липидной смеси. Таким образом удается разделить смеси жирных кислот с различной длиной углеродной цепи и различной степенью ненасыщенности (рис. 10-24, д).

Путем специфического гидролиза можно определить строение липида

При определенных условиях некоторые липиды подвергаются деградации. Например, все жирные кислоты, связанные сложноэфирной связью в триацилглицеридах, фосфолипидах и эфирах стероидов, высвобождаются при мягкой обработке кислотами или щелочами, а при гидролизе в более жестких условиях отщепляются связанные амидной связью жирные кислоты из сфинголипидов. Ферменты, которые специфически гидролизуют определенные липиды, также используются при установлении строе-

ния липидов. Каждая из фосфолипаз А, С и D (рис. 10-16) расщепляет определенные связи в фосфолипидах с образованием продуктов, обладающих характерными растворимостью и хроматографическим поведением. Например, фосфолипаза С высвобождает растворимый в воде фосфорилированный спирт (так, из фосфатидилхолина получается фосфохолин) и растворимый в хлороформе диацилглицерин. Каждый из них можно охарактеризовать по отдельности для определения строения исходного фосфолипида. При комбинации специфического гидролиза и анализа продуктов гидролиза с помощью методов тонкослойной, газожидкостной или высокоэффективной жидкостной хроматографии часто удается расшифровать структуру липида.

Методом масс-спектрометрии можно полностью расшифровывать структуру липида

Для однозначного определения длины углеводородной цепи или положения двойных связей применяют метод масс-спектрометрического анализа липидов или их летучих производных. Химические свойства родственных липидов (например, в составе которых две жирные кислоты с одинаковой длиной углеродной цепи и с ненасыщенными связями в разных положениях, или двух изопреноидов с разным числом изопреновых единиц) очень сходны, поэтому хроматографически обнаружить различия между ними трудно. Однако элюат, выходящий с хроматографической колонки, можно далее подавать в масс-спектрометр и идентифицировать компоненты разделенной липидной смеси по характерной картине фрагментации (рис. 10-25).

Липидомика занимается классификацией липидов и их функций

При изучении биологической роли липидов в клетках и тканях важно знать, какие липиды и в каком количестве присутствуют в данной клетке или ткани, а также каким образом липидный состав меняется в процессе эмбрионального развития, при различных заболеваниях и при приеме определенных лекарств. Изучение липидов привело к тому, что нам уже известны тысячи природных липидов. Поэтому была введена новая номенклатура, позволяющая упростить исполь-

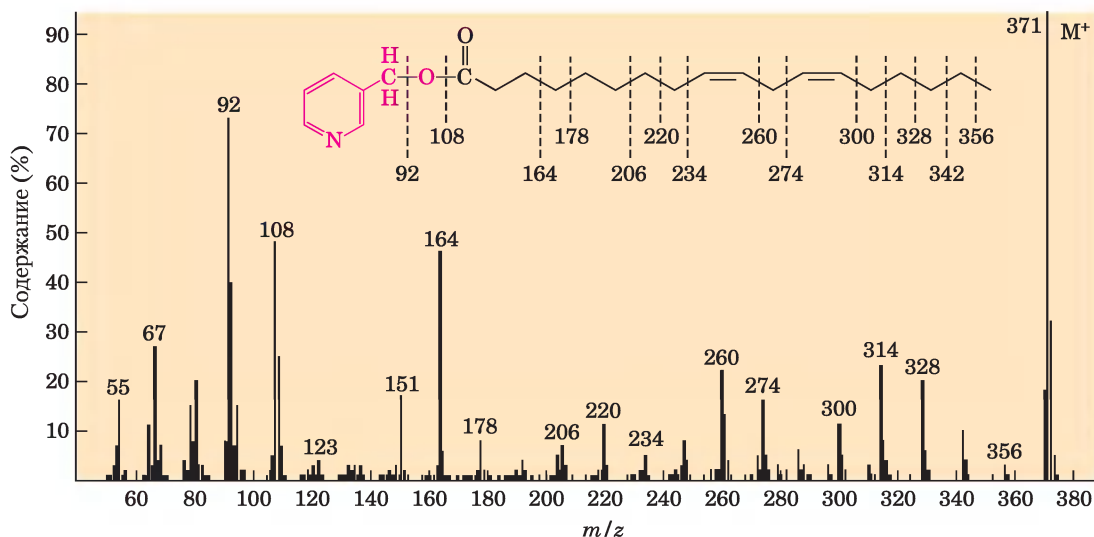


Рис. 10-25. Определение строения жирной кислоты с помощью масс-спектрометра. Жирная кислота превращается в производное, обеспечивающее минимизацию миграции двойных связей в процессе фрагментации молекулы электронной бомбардировкой. Производное — пиколиновый эфир линолевой кислоты (18:2($\Delta^{9,12}$); $M_r = 371$) содержит спирт пиколинол (красный цвет). При бомбардировке потоком электронов эта молекула превращается в ион (M^+ ; $M_r = 371$), в котором атом N несет положительный заряд, и дает ряд более мелких фрагментов при разрыве связей C–C в жирной кислоте. Масс-спектрометр разделяет эти заряженные фрагменты в соответствии с соотношением масса/заряд (m/z). (Для ознакомления с основами масс-спектрометрии см. доп. 3-2.)

На масс-спектре хорошо выявляются ионы с $m/z = 92, 108, 151$ и 164 . Они содержат пиридинового кольца пиколинола и различные фрагменты карбоксильной группы. Это доказывает, что изучаемое соединение действительно пиколиновый эфир. Молекулярный ион ($m/z = 371$) подтверждает присутствие жирной кислоты C-18 с двумя двойными связями. Группа ионов с массой 14 единиц (u) возникла при потере каждой последующей метильной или метиленовой группы с метильного конца ацильной цепочки (начиная с C-18; здесь — правый конец молекулы), пока не достигается ион с $m/z = 300$. Затем следует интервал в 26 единиц u — углеводороды с двойной связью в конце цепи, $m/z = 274$; далее интервал в 14 единиц u — отщепление метиленовой группы C-11, $m/z = 260$ и т. д. Таким образом определяют полное строение, но по этим данным нельзя сделать вывод о конфигурации (*цис*- или *транс*-) двойных связей.

зование баз данных липидных структур. Согласно новой номенклатуре, липиды были отнесены к восьми категориям (табл. 10-3), для которых предложен в качестве обозначений двухбуквенный код. В каждой категории липиды разделены на классы и подклассы с соответствующим номером. Например, глицерофосфохолин — GP01; глицерофосфохолин, сложный эфир с двумя жирными кислотами — GP0101; или сложный эфир по положению 1 (одна жирная кислота) и 2 (другая жирная кислота) — GP0102, т. е. жирные кислоты также указывают цифрами в этом идентификационном номере липида.

Этот 12-значный номер однозначно определяет любой липид, включая еще необнаруженные (неоткрытые). В этой номенклатуре отражается даже природа вещества-предшественника в биосинтезе. Например, пренолы (такие как долихолы и витамины E и K) образуются из изопренильных предшественников. К поликетидам, не обсуждавшимся в данной главе, относятся некоторые природные вещества (среди них много токсичных), путь биосинтеза которых связан с биосинтезом жирных кислот. Восемь категорий, представленных в табл. 10-3, не совпадают с классификацией по биологическим функциям,

Таблица 10-3 Восемь основных категорий природных липидов

Категория	Код категории	Примеры
Жирные кислоты	FA	Олеиновая кислота, стероил-СоА, пальмитоилкарнитин
Глицеролипиды	GL	Ди- и триацилглицериды
Глицерофосфолипиды	GP	Фосфатидилхолин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин
Сфинголипиды	SP	Сфингомиелин, ганглиозид GM2
Липиды-стероиды	ST	Холестерин, прогестерон, желчные кислоты
Липиды-пренолы	PR	Фарнезол, гераниол, ретинол, убихинон
Сахаролипиды	SL	Липополисахариды
Поликетиды	PK	Тетрациклин, афлатоксин В ₁

которой мы пользовались в настоящей главе. Например, к структурным липидам мембран мы относим как глицерофосфолипиды, так и сфинголипиды, а в табл. 10-3 они попали в разные категории. Заметим, что у каждого способа классификации есть свои преимущества.

Если определить липидный состав клетки с помощью метода масс-спектрометрии, можно составить полный количественный каталог липидов данной клетки в конкретных физиологических условиях — так называемый **липидом**. Можно проанализировать изменения, происходящие с клеточными липидами в процессе дифференцировки, при раковых заболеваниях, при приеме тех или иных лекарств и т. д. В животной клетке содержится около тысячи различных липидов, причем каждый из них выполняет свою функцию. На сегодняшний день известны функции достаточно большого числа липидов, однако многое еще предстоит узнать.

Краткое содержание раздела 10.4 МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЛИПИДОВ

- При определении состава липиды сначала экстрагируют из тканей органическими растворителями, затем разделяют хроматографически (методами тонкослойной, газожидкостной хроматографии или ВЭЖХ).
- Чтобы получить более простые соединения для последующего анализа, могут использоваться фосфолипазы, специфические для одной из связей в фосфолипиде.

- Липиды идентифицируют по хроматографическому поведению, чувствительности к гидролизу специфическими ферментами или с помощью масс-спектрометрии.
- В липидомике применяются мощные аналитические методы для определения полного липидного состава клетки или ткани (липидома), а также для создания аннотированных баз данных, позволяющих сравнивать между собой липиды из клеток разных типов и находящихся в различных условиях.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

Витамин 510	Нейтральные
Витамин А (ретинол) 511	гликолипиды 502
Витамин D ₃ 510	Плазмалогены 497
Витамин Е 512	Полиненасыщенные
Витамин К 512	жирные кислоты
Галактолипиды 500	(ПНЖК) 489
Ганглиозиды 502	Простагландины 508
Гликолипиды 496	Стерины 504
Гликосфинголипиды 502	Сфинголипиды 501
Глицерофосфолипид 497	Сфингомиелин 502
Глобозиды 502	Токоферолы 512
Долихол 513	Триацилглицериды 491
Жирная кислота 487	Тромбоксаны 508
Лейкотриены 508	Фосфолипиды 496
Липазы 491	Холестерин 504
Липидом 519	Холекальциферол 510
Липиды, с простой эфирной связью 499	Церамид 502
	Цереброзиды 502

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общая литература

Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Jr., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meers, G., Van-Nieuwenhze, M.S., White, S.H., Witztum, J.L., & Dennis, E.A. (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.* **46**, 839–862.

Новая номенклатура природных липидов, включает восемь основных категорий. Полное описание классификации липидов.

Gurr, M.I. & Harwood, J.L. (1991) *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 4th eds, Chapman & Hall, London.

Хороший источник сведений о строении и метаболизме липидов. Статья среднего уровня сложности.

Vance, D.E. & Vance, J.E. (eds) (2002) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, New Comprehensive Biochemistry, Vol. 36, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

Великолепное собрание обзоров по различным аспектам строения, биосинтеза и функций липидов.

Липиды в пище

Angerer, P. & von Schacky, C. (2000) Omega-3 polyunsaturated fatty acids and the cardiovascular system. *Curr. Opin. Lipidol.* **11**, 57–63.

Covington, M.B. (2004) Omega-3 fatty acids. *Am. Fam. Physician* **70**, 133–140.

Краткое изложение результатов изучения снижения риска сердечно-сосудистых заболеваний под действием омега-3 жирных кислот.

de Logeril, M., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Delaye, J., & Marnier, N. (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* **99**, 779–785.

Mozaffarian, D., Katan, M.B., Ascherio, P.H., Stampfer, M.J., & Willet, W.C. (2006) Trans fatty acids and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1601–1613.

Обзор подтверждений того, что наличие в пище транс-жиров провоцирует возникновение ишемической болезни сердца.

Структурные липиды в мембранах

Bogdanov, M. & Dowhan, W. (1999) Lipid-assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* **274**, 36827–36830.

Мини-обзор о роли мембранных липидов в фолдинге (укладке) мембранных белков.

De Rosa, M. & Gambacorta, A. (1988) The lipids of archaeobacteria. *Prog. Lipid Res.* **27**, 153–175.

Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199–232.

Gravel, R.A., Kaback, M.M., Proia, R., Sandhoff, K., Suzuki, K., & Suzuki, K. (2001) The GM₂ gangliosidosis. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th edn (Scriver, C.R., Sly, W.S., Childs, B., Beaudet, A.L., Valle, D., Kinzler, K.W., & Vogelstein, B., eds), pp. 3827–3876, McGraw-Hill, Inc., New York.

Эта статья содержит точные описания клинических, биохимических и генетических аспектов метаболических болезней человека. Авторитетный источник и увлекательное чтение.

Hoekstra, D. (ed.) (1994) *Cell Lipids*, Current Topics in Membranes, Vol. 4, Academic Press, Inc., San Diego.

Липиды как сигнальные вещества, кофакторы и пигменты

Bell, R.M., Exton, J.H., & Prescott, S.M. (eds) (1996) *Lipid Second Messengers*, Handbook of Lipid Research, Vol. 8, Plenum Press, New York.

Binkley, N.C. & Suttie, J.W. (1995) Vitamin K nutrition and osteoporosis. *J. Nutr.* **125**, 1812–1821.

Brigelius-Flohe, R. & Traber, M.G. (1999) Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* **13**, 1145–1155.

Chojnacki, T. & Dallner, G. (1988) The biological role of dolichol. *Biochem. J.* **251**, 1–9.

Clouse, S.D. (2002) Brassinosteroid signal transduction: clarifying the pathway from ligand perception to gene expression. *Mol. Cell* **10**, 973–982.

Lemmon, M.A. & Ferguson, K.M. (2000) Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem. J.* **350**, 1–18.

Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Staffbrini, D.M., & McIntyre, T.M. (2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 419–445.

Schneiter, R. (1999) Brave little yeast, please guide us to Thebes: sphingolipid function in *S. cerevisiae*. *BioEssays* **21**, 1004–1010.

Suttie, J.W. (1993) Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *FASEB J.* **7**, 445–452.

Vermeer, C. (1990) γ -Carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem. J.* **266**, 625–636.

Дает биохимическое обоснование необходимости витамина К для свертывания крови и важности карбоксилирования в синтезе белка тромбина.

Viitala, J. & Jarnefelt, J. (1985) The red cell surface revisited. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 392–395.

Содержит обсуждение детерминант, определяющих типы крови А, В и 0.

Weber, H. (2002) Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci.* **7**, 217–224.

Zittermann, A. (2001) Effects of vitamin K on calcium and bone metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **4**, 483–487.

Методы анализа липидов

Christie, W.W. (1998) Gas chromatography-mass spectrometry methods for structural analysis of fatty acids. *Lipids* **33**, 343–353.

Детальное описание методов, используемых для получения данных, аналогичных представленным на рис. 10-25.

Christie, W.W. (2003) *Lipid Analysis*, 3rd edn, The Oily Press, Bridgwater, England.

German, J.B., Gillies, L.A., Smilowitz, J.T., Zivkovic, A.M., & Watkins, S.M. (2007) Lipidomics and lipid profiling in metabolomics. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 66–71.

Краткий обзор задач и методов липидомики.

Griffiths, W., Desiderio, D.M., & Nibbering, N.M. (2007) *Lipid Mass Spectrometry in Metabolomics and Systems Biology*, Wiley InterScience, New York.

Hamilton, R.J. & Hamilton, S. (eds) (1992) *Lipid Analysis: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford University Press, New York.

Matsubara, T. & Hagashi, A. (1991) FAB/mass spectrometry of lipids. *Prog. Lipid Res.* **30**, 301–322.

Дискуссия об идентификации липидов с помощью мощного метода определения структуры — масс-спектрометрического анализа (для специалистов).

Вопросы и задачи

1. Обсуждение термина «липиды». Что такое «липид»? Чем липиды отличаются от других биомолекул — аминокислот, нуклеиновых кислот и белков?

2. Температуры плавления липидов. Липиды содержат жирные кислоты с 18 атомами углерода. Температуры плавления кислот: стеариновая кислота +69,6 °С, олеиновая кислота +13,4 °С, линолевая кислота –5 °С, линоленовая кислота –11 °С.

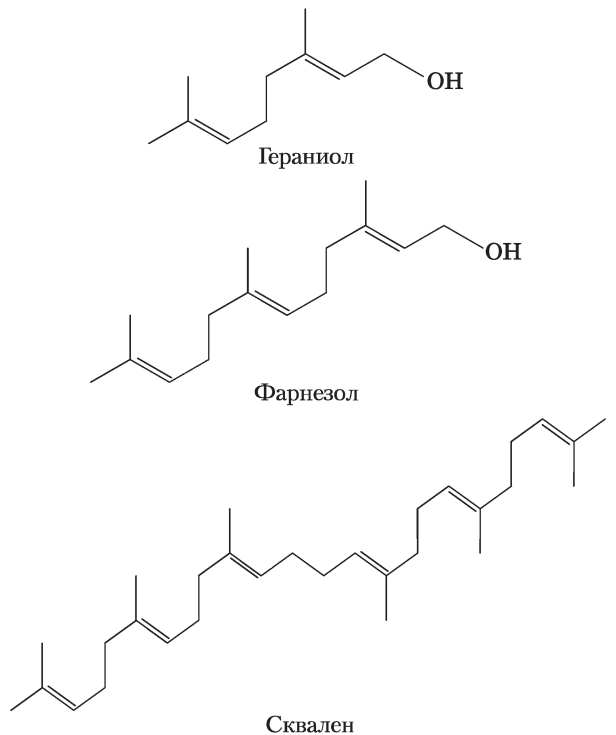
а) Какая особенность строения этих 18-углеродных жирных кислот может коррелировать с температурой плавления? Какова общая закономерность изменения температуры плавления.

б) Изобразите все возможные триацилглицериды, которые могут быть образованы из глицерина, пальмитиновой и олеиновой кислот.

в) Жирные кислоты с разветвленной углеродной цепью обнаружены в некоторых мембранных липидах бактерий. Будет ли их присутствие увеличивать или уменьшать текучесть мембран (т. е. придавать им более низкую или более высокую точку плавления)? Почему?

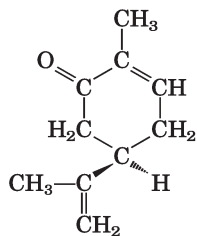
3. Приготовление соуса Bearnaise. Во время приготовления соуса Bearnaise яичные желтки вбиваются в расплавленное масло, чтобы стабилизировать соус и избежать расслаивания (разделения фаз). Стабилизирующим агентом в яичном желтке является лецитин (фосфатидилхолин). Предположите, почему он так действует.

4. Изопреновое звено в изопреноидах. Гераниол, фарнезол и сквален — изопреноиды, поскольку они образуются из пятиуглеродного изопренового звена. Для каждого соединения обведите пятиуглеродный участок, который соответствует изопреновому звену (см. рис. 10-22).

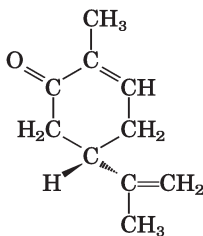


5. Номенклатура стереоизомеров липидов. Два соединения, изображенные ниже, являются стереоизомерами карвона и отличаются по свойствам. Вещество, изображенное слева, пахнет мятой,

а справа — тмином. Назовите эти вещества в соответствии с *RS*-номенклатурой.

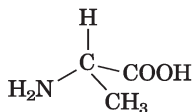


Мята

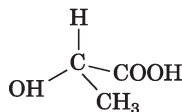


Тмин

6. *RS*-номенклатура для аланина и лактата. Нарисуйте (изображая связи в виде клиньев) и подпишите *R*- и *S*-изомеры 2-аминопропановой кислоты (аланина) и 2-гидроксипропановой кислоты (молочной кислоты).



2-Аминопропановая кислота (аланин)



2-Гидроксипропановая кислота (молочная кислота)

7. Гидрофобные и гидрофильные компоненты мембранных липидов. Общим структурным свойством мембранных липидов является их амфифильная природа. Например, в фосфатидилхолине две жирнокислотные цепочки гидрофобны, а фосфохолиновая «головка» гидрофильна. Для каждого из следующих мембранных липидов назовите гидрофобные и гидрофильные компоненты: а) фосфатидилэтаноламин; б) сфингомиелин; в) галактозилцереброзид; г) ганглиозид; д) холестерин.

8. Структура омега-6 жирной кислоты. Изобразите структуру омега-6 жирной кислоты 16:1.

9. Каталитическое гидрирование растительных масел. Каталитическое гидрирование, используемое в пищевой промышленности, приводит к превращению двойных связей жирных кислот в связи $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$. Как это изменение влияет на физические свойства масел?

10. Триацилглицериды в щелочной среде неустойчивы. Обычно для очистки жируловителя в раковине добавляют средство, содержащее ги-

дроксид натрия. Объясните, на чем основан этот прием?

11. Установление строения липида по его составу. Анализ состава липида показал, что в нем на один моль жирной кислоты приходится строго один моль неорганического фосфата. Может ли этот липид быть глицерофосфолипидом? Ганглиозидом? Сфингомиелином?

12. Определение структуры липида на основании молярного отношения компонентов. Полный гидролиз глицерофосфолипидов привел к образованию глицерина, двух жирных кислот (16:1(Δ^9) и 16:0), фосфорной кислоты и серина в соотношении 1:1:1:1. Назовите этот липид и изобразите его структурную формулу.

13. Свойства воска. Какое свойство восковой кутикулы, покрывающей листья растений, делает листья непромокаемыми?

14. Действие фосфолипаз. Яды восточной гремучей змеи и индийской кобры содержат фосфолипазу A_2 , катализирующую гидролиз жирных кислот по положению С-2 глицерофосфолипидов. Продуктом распада фосфолипида в этой реакции является лизолецитин (лецитин — это фосфатидилхолин). При высоких концентрациях этот и другие лизофосфолипиды действуют как детергенты, разрушая мембраны эритроцитов и лизируя клетки. Интенсивный гемолиз может представлять угрозу для жизни.

а) Все детергенты амфифильны. Что представляют собой гидрофильная и гидрофобная части лизолецитина?

б) Боль и воспаление, вызванные укусом змеи, можно ослабить с помощью некоторых стероидных препаратов. Почему?

в) Хотя большое количество фосфолипазы A_2 может быть смертельно опасно, этот фермент необходим для ряда нормальных метаболических процессов. Что это за процессы?

15. Липиды в определении групп крови. Выше мы упомянули (см. рис. 10-15), что строение гликосфинголипида определяет группы крови А, В и 0 у человека. Однако верно также то, что гликопротеины также определяют группы крови. Каким образом возможно, что оба эти утверждения справедливы?

16. Внутриклеточные мессенджеры из фосфатидилинозитов. Когда гормон вазопрессин стимулирует расщепление фосфатидилинозит-4,5-бисфосфата чувствительной к гормону фосфолипазой C, образуются два продукта. Что это за продукты? Сравните их свойства и их растворимость в воде и предскажите, будут ли они легко диффундировать через цитозоль.

17. Депо жирорастворимых витаминов. В противоположность водорастворимым витаминам, которые должны ежедневно поступать с пищей, жирорастворимые витамины могут накапливаться в организме человека в количестве, достаточном для потребления в течение многих месяцев. Предложите объяснение этого различия, основываясь на растворимости витаминов.

18. Гидролиз липидов. Назовите продукты мягкого гидролиза разбавленным NaOH а) 1-стеароил-2,3-дипальмитоилглицерина; б) 1-пальмитоил-2-олеилфосфатидилхолина.

19. Влияние полярности на растворимость. Расположите следующие соединения в порядке увеличения растворимости в воде: триацилглицерин; диацилглицерин и моноацилглицерин, причем все они содержат только пальмитиновую кислоту.

20. Хроматографическое разделение липидов. Смесь липидов наносят в колонку с силикагелем, затем промывают колонку растворителями с нарастающей полярностью. Смесь состоит из фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина, фосфатидилхолина, холестерилпальмитата (стериновый эфир), сфингомиелина, пальмитата, *n*-тетрадеканола, триацилглицерина и холестерина. В каком порядке следует ожидать выхода липидов с колонки? Объясните свои предположения.

21. Идентификация неизвестных липидов. Йохан Тудикум, около 100 лет тому назад имевший врачебную практику в Лондоне, в свободное время занимался также химией. Он выделил целый ряд липидов из нервной ткани, охарактеризовал многие из них и дал им названия. Тщательно запечатанные и надписанные еще им сосуды с выделенными липидами были вновь исследованы через много лет.

а) Как бы вы подтвердили, используя методы, недоступные Тудикуму, что сосуды с надписями «сфингомиелин» и «церебросид» действительно содержат эти вещества?

б) Как бы вы отличили сфингомиелин от фосфатидилхолина, используя химические, физические или ферментативные методы исследования?

22. Нингидрин для обнаружения липидов на ТСХ-пластинках. Нингидрин специфически реагирует с первичными аминами, образуя пурпурно-голубой продукт. При тонкослойной хроматографии фосфолипидов печени крыс пластинка проявляется путем опрыскивания нингидрином. Какие фосфолипиды можно определить таким образом?

Анализ экспериментальных данных —

23. Определение строения аномального липида при болезни Тея–Сакса. На рис. 1 в доп. 10-2 показано, как происходит распад ганглиозидов у здоровых людей и у людей с определенными генетическими заболеваниями. Некоторые из приведенных данных взяты из статьи Ларса Свеннерхольма (1962). Черным ромбиком на рисунке обозначена сиаловая кислота (Neu5Ac, N-ацетилнейраминавая кислота).

Свеннерхольм сообщал, что около 90% моносиалоганглиозидов, выделенных из нормального головного мозга, представляют собой вещество, состоящее из церамида, гексозы, N-ацетилгалактозамина и N-ацетилнейраминавой кислоты в молярном отношении 1:3:1:1.

а) Какой из ганглиозидов (от GM1 до GM3 и глобозид) на рис. 1 в доп. 10-2 соответствует этому описанию? Объясните свой ответ.

б) Свеннерхольм также обнаружил, что 90% ганглиозидов пациента с болезнью Тея–Сакса состоят из тех же компонентов, но в ином молярном отношении: 1:2:1:1. Соответствует ли это данным, приведенным на рисунке в доп. 10-2? Объясните свой ответ.

Для более точного определения строения ганглиозида Свеннерхольм обработал его нейраминидазой, удаляющей N-ацетилнейраминавую кислоту. Образовавшийся десилированный ганглиозид гораздо легче анализировать. Свен-

нерхолм обработал его кислотой, собрал церамидсодержащие продукты и определил молярное отношение сахаров в каждом продукте. Он проделал данную процедуру как для нормального, так и для аномального ганглиозида. Результаты этого эксперимента представлены ниже.

Ганглиозид	Церамид	Глюкоза	Галактоза	Галактозамин
<i>Норма</i>				
Фрагмент 1	1	1	0	0
Фрагмент 2	1	1	1	0
Фрагмент 3	1	1	1	1
Фрагмент 4	1	1	2	1
<i>Болезнь</i>				
Фрагмент 1	1	1	0	0
Фрагмент 2	1	1	1	0
Фрагмент 3	1	1	1	1

в) На основании представленных результатов сделайте вывод о структуре нормального ганглиозида. Соответствует ли это данным, приведенным в доп. 10-2? Объясните свои рассуждения.

г) Что можно сказать о строении аномального ганглиозида? Соответствует ли это строение

данным, приведенным в доп. 10-2? Объясните свои рассуждения.

Кроме того, Свеннерхолм обратился к работе других исследователей, которые осуществляли перметилирование нормального десиазированного ганглиозида. Перметилированием называют исчерпывающее метилирование; при этом метильная группа присоединяется к каждой свободной гидроксильной группе сахара. Исследователи обнаружили, что в результате реакции получались следующие сахара: 2,3,6-триметилгликопираноза, 2,3,4,6-тетраметилгалактопираноза, 2,4,6-триметилгалактопираноза и 4,6-диметил-2-дезоксигалактопираноза.

д) Какому сахару из группы GM1 соответствует каждый из продуктов перметилирования? Объясните свой ответ.

е) Используя все приведенные данные, ответьте, какая информация о строении нормального ганглиозида отсутствует?

Литература

Svennerholm, L. (1962) The chemical structure of normal human brain and Tay-Sachs gangliosides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **9**, 436–441.

Чем крепче забор — тем дружнее соседи.

Роберт Фрост, «Починка стены» в сб. «На север от Бостона», 1914

11

Биологические мембраны и транспорт

11.1. Состав и строение мембран 526

11.2. Динамика мембран 538

11.3. Транспорт веществ через мембраны 550

Первая клетка, вероятно, возникла, когда сформировалась мембрана, отделяющая небольшой объем водного раствора от остального мира. Мембраны образуют внешние границы клеток и регулируют движение молекул через эти границы (рис. 11-1). В клетках эукариот они делят внутреннее пространство на отдельные компартменты, чтобы обособить процессы и компоненты. Они организуют сложные последовательности реакций и являются главными как для запасания биологической энергии, так и для формирования межклеточных контактов. Биологические функции мембран проистекают из их замечательных физических свойств. Мембраны пластичны, способны к самогерметизации, избирательно проницаемы для полярных веществ. Благодаря пластичности мембран форма клеток может изменяться при клеточном росте и движении (например, при амебоидном движении). Обладая способностью к разрыву и замыканию, две мембраны могут сливаться, как при экзоцитозе; единичный ограниченный мембраной компартмент без больших утечек содержимого может делиться на два отдельных компартмента, как при эндоцитозе и клеточном делении. Поскольку мембраны обладают избирательной проницаемостью, они удерживают

некоторые вещества и ионы внутри клеток и внутри отдельных клеточных компартментов, не пропуская внутрь другие.

Мембраны не просто пассивные барьеры. В них содержится множество белков, предназначенных для облегчения или катализа различных клеточных процессов. На клеточной поверхности переносчики перемещают специфические органические вещества и неорганические ионы через мембрану; рецепторы воспринимают внеклеточ-



Рис. 11-1. Биологические мембраны. На поперечном срезе все клеточные мембраны имеют характерный трехслойный вид. После окрашивания эритроцита тетроксидом осмия его плазматическая мембрана выглядит на электронной микрофотографии как трехслойная структура толщиной от 5 до 8 нм (50–80 Å). Трехслойное изображение состоит из двух электроноплотных слоев, разделенных менее плотной центральной областью (осмий связывается с внутренней и внешней поверхностями мембраны).

ные сигналы и запускают молекулярные изменения в клетке; адгезивные молекулы удерживают вместе соседние клетки. Внутри клетки мембраны организуют клеточные процессы, такие как синтез липидов и некоторых белков, и перенос энергии в митохондриях и хлоропластах. Поскольку мембраны состоят только из двух молекулярных слоев, они очень тонкие — практически двумерные. Межмолекулярные столкновения в этом двумерном пространстве гораздо более вероятны, так что эффективность ферментативных процессов в мембране чрезвычайно увеличивается.

В этой главе мы прежде всего опишем состав клеточных мембран и их химическое строение — молекулярные структуры, которые лежат в основе их биологических функций. Затем рассмотрим замечательные динамические свойства мембран, в которых липиды и белки взаимно перемещаются. Обсудим динамическую роль мембранных белков при клеточной адгезии, эндоцитозе и слиянии мембран, сопровождающем секрецию нейромедиаторов. Потом мы обратимся к опосредованному белками перемещению веществ через мембраны при помощи переносчиков и ионных каналов. В последующих главах мы обсудим роль мембран в передаче сигналов (гл. 12 и 23), переносе энергии (гл. 19), синтезе липидов (гл. 21) и синтезе белков (гл. 27).

11.1. Состав и строение мембран

Для понимания функционирования мембран важное значение имеет изучение их состава — ка-

кие молекулы встречаются во всех мембранах, а какие уникальны для мембран со специфическими функциями. Поэтому, прежде чем перейти к структуре и функциям мембран, рассмотрим молекулярный состав биологических мембран: белки и полярные липиды, которые составляют основную часть мембран, и углеводы (гликопротеины и гликолипиды).

Каждый тип мембран содержит характерные липиды и белки

Относительное содержание белков и липидов меняется в зависимости от типа мембран (табл. 11-1), отражая различие биологических функций. Например, некоторые нейроны имеют миелиновую оболочку — протяженную плазматическую мембрану, которая многократно окружает клетку и действует как пассивный электрический изолятор. Миелиновая оболочка в основном состоит из липидов, в то время как плазматические мембраны бактерий и мембраны митохондрий и хлоропластов, в которых сосредоточены многие ферментативные процессы, содержат больше (по массе) белков, чем липидов.

Для изучения состава мембраны первой задачей является ее изоляция. Когда клетки подвергаются механическому измельчению, их плазматическая мембрана разрывается и фрагментируется, при этом высвобождаются цитоплазматические компоненты и мембраносвязанные органеллы — митохондрии, хлоропласты, лизосомы и ядра. Фрагменты плазматической мембраны и интактные органеллы можно выделить путем центрифугирования (рис. 1-8 и пример 2-1 на с. 87).

Таблица 11-1 Состав плазматических мембран у различных организмов

	Компоненты (% по массе)			Фосфолипиды	Стерины
	Стерин	Другие липиды	Белки		
Миелиновая оболочка нейронов человека	30	30	19	холестерин	галактолипиды, плазмалогены
Печень мыши	45	27	25	холестерин	—
Листья кукурузы	47	26	7	ситостерин	галактолипиды
Дрожжи	52	7	4	эргостерин	триацилглицерины, эфиры стеринов
р. <i>Paramecium</i> (инфузория)	56	40	4	стигмастерин	—
<i>E. coli</i>	75	25	0	—	—

Примечание: суммарный состав не достигает 100 %, поскольку кроме белков, фосфолипидов и стеринов имеются и другие вещества. Например, растения содержат большие количества гликолипидов.

В клетках, несомненно, есть механизмы контроля типов и количества мембранных липидов на пути от их синтеза до доставки конкретных липидов в определенные органеллы. Каждое царство, каждый вид, каждая ткань или тип клеток, а также органеллы каждого типа клеток обладают характерным набором мембранных липидов. Например, плазматические мембраны обогащены холестерином и не содержат сколько-нибудь заметных количеств кардиолипина (рис. 11-2); во

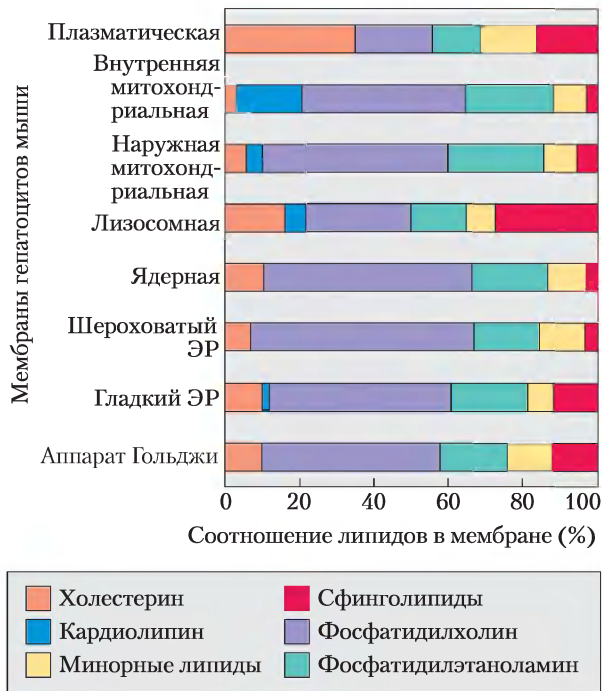


Рис. 11-2. Липидный состав плазматических мембран и мембран органелл гепатоцитов крысы. Функциональная специализация каждого типа мембраны отражается в уникальном составе липидов. Холестерин в значительных количествах присутствует в плазматических мембранах, но обнаруживается в следовых количествах в мембранах митохондриальных. Кардиолипин — существенный компонент внутренней митохондриальной, но не плазматической мембраны. В большинстве мембран фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и фосфатидилглицерин — минорные компоненты (желтый цвет), но они выполняют важнейшие функции, например фосфатидилинозит и его производные участвуют в передаче гормональных сигналов. Сфинголипиды, фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин присутствуют в большинстве мембран, но в разных соотношениях. Гликолипидов много в мембранах хлоропластов растений, а в тканях животных они практически отсутствуют.

внутренних мембранах митохондрий гепатоцитов распределение обратное: очень мало холестерина и много кардиолипина. За редким исключением, мы можем говорить об адаптивной роли разных комбинаций мембранных липидов; в других случаях функциональное значение этих комбинаций пока неизвестно.

Белковый состав мембран изменяется даже в более широких пределах, чем липидный, отражая их функциональную специализацию. Некоторые мембранные белки ковалентно связаны с олигосахаридами. Например, 60% (по массе) молекул гликофорина — гликопротеина мембраны эритроцитов — состоят из сложных олигосахаридных единиц, ковалентно присоединенных к специфическим аминокислотным остаткам. Чаще всего сахара присоединяются по остаткам Ser, Thr и Asn (рис. 7-29). Остатки сахаров поверхностных гликопротеинов влияют на фолдинг белков, а также на их стабильность и внутриклеточную локализацию. Они играют существенную роль в специфическом связывании лигандов с гликопротеиновыми поверхностными рецепторами (рис. 7-35).

Некоторые мембранные белки ковалентно связаны с липидами (одним или более), служащими гидрофобными якорями, которые, как мы увидим, удерживают белки в мембране.

Все биологические мембраны обладают рядом фундаментальных свойств

Мембраны непроницаемы для большинства полярных или заряженных веществ, но проницаемы для неполярных соединений; толщина мембран от 5 до 8 нм (50–80 Å); на поперечном срезе в электронном микроскопе они выглядят трехслойными (рис. 11-1). По данным электронной микроскопии, химического анализа состава, а также физических методов исследования проницаемости мембран и движения отдельных молекул липидов и белков внутри мембраны создана **жидкостно-мозаичная модель** биологических мембран (рис. 11-3). Фосфолипиды образуют бислой, где неполярные части молекул обращены внутрь бислоя, а их полярные «головки» обращены наружу и взаимодействуют с водной средой с обеих сторон мембраны. Белки включаются в этот бислойный пласт, удерживаясь между мембранными липидами и гидрофобными доменами белков благодаря сво-

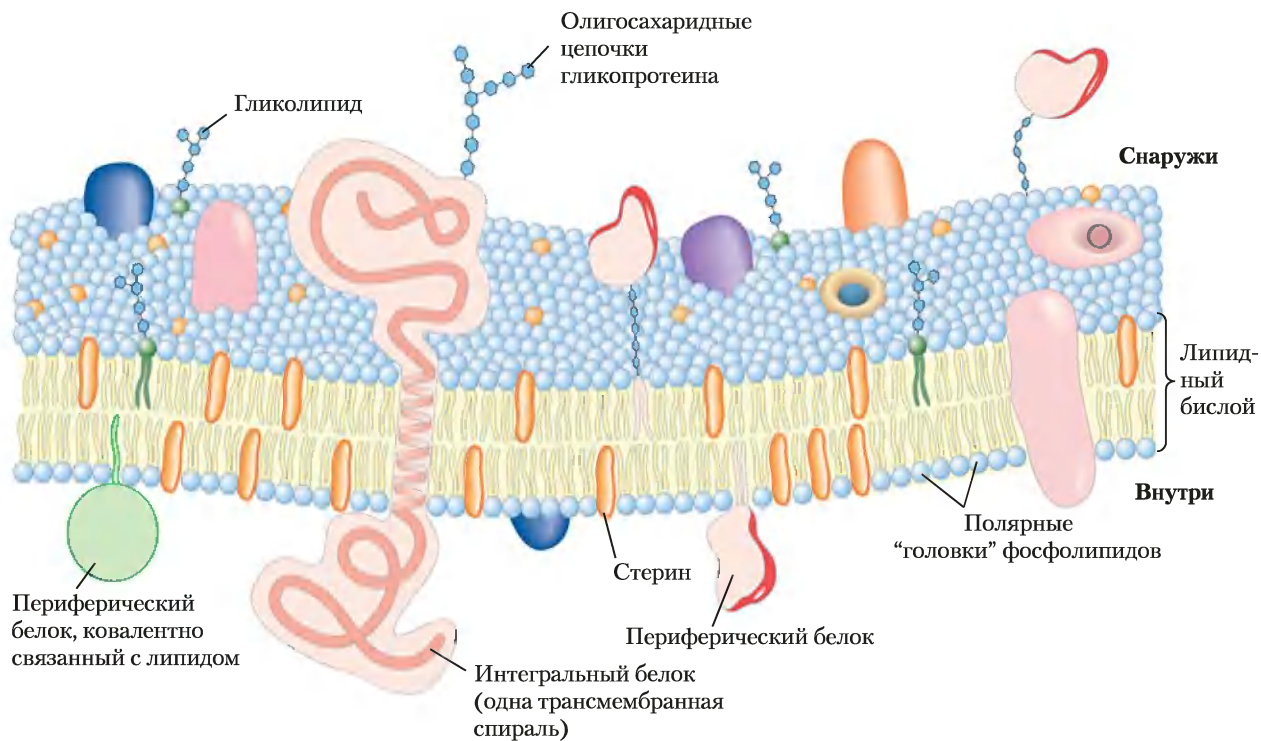


Рис. 11-3. Жидкостно-мозаичная модель мембраны. Жирнокислотные цепочки формируют гидрофобную область внутри мембраны. Интегральные белки плавают в этом липидном «море» благодаря своим гидрофобным свойствам, обусловленным наличием неполярных боковых цепей аминокислот. И белки, и липиды могут свободно двигаться вдоль плоскости бислоя, но движение с одной стороны бислоя на другую ограничено. Углеводные части, связанные с некоторыми белками и липидами плазматической мембраны, находятся на внешней поверхности мембраны.

им гидрофобным взаимодействиям. Некоторые белки «высовываются» только с одной стороны мембраны, в других есть домены, экспонированные с обеих сторон. Ориентация белков в бислое асимметрична, что придает мембране «двусторонность»: белковые домены на одной стороне бислоя отличаются от доменов на другой стороне, что отражает и функциональную асимметрию. Отдельные липидные и белковые единицы в мембране формируют постоянно изменяющуюся жидкую мозаичную структуру (в отличие от мозаики керамической плитки, уложенной на цемент). Мембранная мозаика — жидкая, так как большинство взаимодействий между ее компонентами нековалентные; липиды и белки способны свободно двигаться вдоль плоскости мембраны.

Теперь рассмотрим некоторые особенности жидкостно-кристаллической модели более детально и приведем экспериментальные доказа-

тельства в пользу основной идеи предложенной модели, однако с необходимыми усовершенствованиями.

Липидный бислой — главный элемент структур биомембран

Глицерофосфолипиды, сфинголипиды и стерины практически нерастворимы в воде. При смешивании с водой они самопроизвольно образуют микроскопические липидные агрегаты (кластеры) в виде обособленной фазы, при этом их гидрофобные части находятся в контакте друг с другом, а гидрофильные группы взаимодействуют с окружающей водной средой. Вспомним, что при объединении липидов в кластеры уменьшается площадь гидрофобной поверхности, обращенной в сторону воды, и таким образом минимизируется число молекул из упорядоченной воды на

поверхности раздела липид–вода (рис. 2-7), что приводит к увеличению энтропии. Благодаря гидрофобным взаимодействиям между молекулами липидов создается термодинамическая движущая сила, обеспечивающая образование и сохранение этих кластеров.

При смешивании липидов с водой в зависимости от условий и природы липидов могут образоваться три типа липидных агрегатов (рис. 11-4). **Мицеллы** имеют сферическую форму и не содержат ничего, кроме амфифильных молекул (от нескольких десятков до нескольких тысяч). Эти молекулы расположены таким образом, что их гидрофобные области агрегированы внутри, куда вода не попадает, а их гидрофильные «головки» — к поверхности мембраны и контактируют с водной средой. Мицеллообразование облегчается, когда площадь поперечного сечения «головки» больше, чем площадь круга с диаметром боковой ацильной цепи (цепей), как в свободных жирных кислотах, лизофосфолипидах (фосфолипидах без одной жирной кислоты) и детергентах, таких как додецилсульфат натрия (SDS; с. 136).

Второй тип липидного агрегата в воде — это **бислой**, в котором два липидных монослоя образуют двумерный лист. Легче всего образование бислоя происходит, когда поперечное сечение «головки» по площади равно половине длины ацильной

цепи (цепей), как в глицерофосфолипидах и сфинголипидах. Гидрофобные области каждого монослоя взаимодействуют друг с другом, не касаясь воды. Гидрофильные «головки» взаимодействуют с водой на обеих поверхностях бислоя. Поскольку на краях гидрофобные области (рис. 11-4, б) имеют небольшие контакты с водой, бислойный пласт относительно нестабилен и спонтанно сворачивается, накладываясь сам на себя, образуя полую сферу — **везикулу (пузырек)** (рис. 11-4, в). При образовании везикул бислой теряет свои концевые гидрофобные области, достигая максимальной стабильности в водном окружении. Внутри этих бислойных везикул заключена вода в виде отдельного водного компартмента. Вероятно, предшественники первых живых клеток напоминали липидные пузырьки, их водное содержимое было отделено от остального мира гидрофобной обложкой.

Биологические мембраны состоят из липидных бислоев толщиной 3 нм (30 Å). Углеводородная часть мембраны, составленная из групп $-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_3$ жирных кислот, неполярна и похожа в этом отношении на углеводород декан. Везикулы, сформированные в лаборатории из чистых липидов (липосомы), почти непроницаемы для полярных веществ, как и биологические мембраны (хотя последние проницаемы при наличии специфических переносчиков).

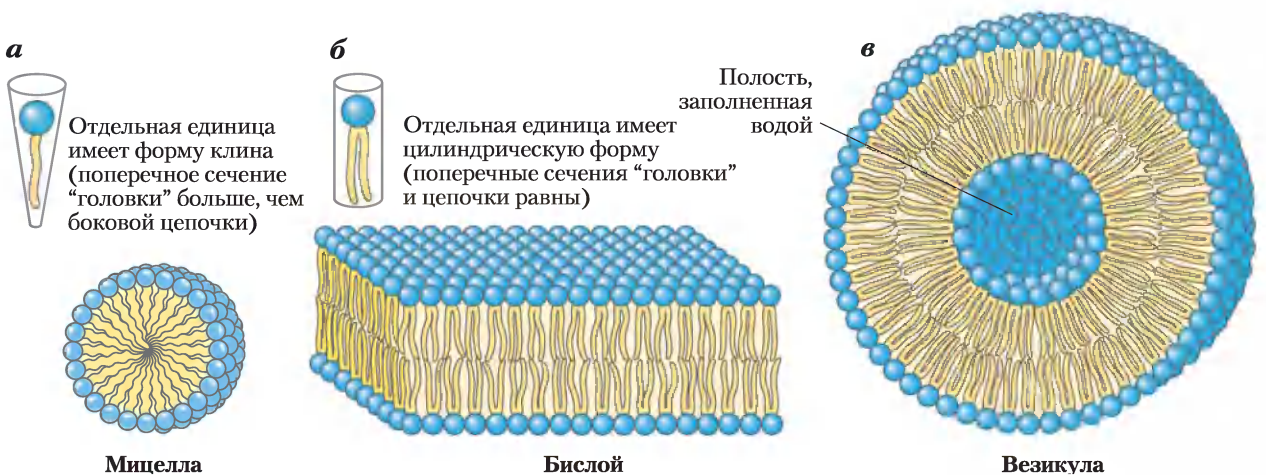


Рис. 11-4. Агрегаты из амфифильных липидов, образующиеся в воде. а) В мицеллах гидрофобные цепи жирных кислот собраны в центре сферы. Внутри гидрофобной области практически нет воды. б) В открытом бислое все боковые ацильные цепочки, кроме тех, которые расположены на краях пласта, защищены от взаимодействия с водой. в) Когда двумерный бислой сворачивается, образуется замкнутый бислой — трехмерный полый пузырек (везикула), в полости которого находится вода.

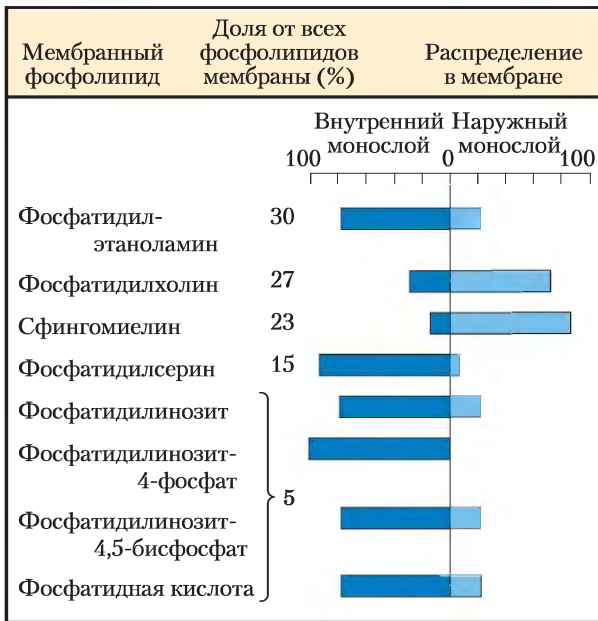


Рис. 11-5. Асимметричное распределение фосфолипидов между внутренним и наружным монослоями плазматической мембраны эритроцита. Распределение специфического фосфолипида определяется при обработке интактной клетки фосфолипазой С, которая не может подействовать на липиды внутреннего монослоя, но удаляет «головки» липидов внешнего монослоя. По содержанию высвобожденных «головок» определяют количества липидов в наружном монослое.

Липиды плазматической мембраны асимметрично распределены между двумя монослоями, хотя в отличие от мембранных белков эта асимметрия не абсолютна. В плазматической мембране эритроцита, например, холинсодержащие липиды (фосфатидилхолин и сфингомиелин) обычно находятся во внешнем (экзоплазматическом) монослое (рис. 11-5), в то время как фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилинозиты гораздо более часто встречаются во внутреннем (цитоплазматическом) монослое. Изменения в распределении липидов между монослоями плазматической мембраны приводят к серьезным последствиям. Например, только когда фосфатидилсерин в плазматической мембране переходит в наружный монослой, тромбоцит способен исполнить свою роль в образовании кровяного сгустка. Для многих других типов клеток наличие фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны служит «меткой» для разрушения клетки путем программируемой клеточной смерти.

Три типа мембранных белков различаются расположением в мембране

Интегральные мембранные белки очень прочно связаны с мембраной, они удаляются только с помощью агентов, которые нарушают гидрофобные взаимодействия, — детергентов, органических растворителей или денатурирующих веществ (рис. 11-6). **Периферические мембранные белки** связываются с мембраной посредством электростатических взаимодействий или образования

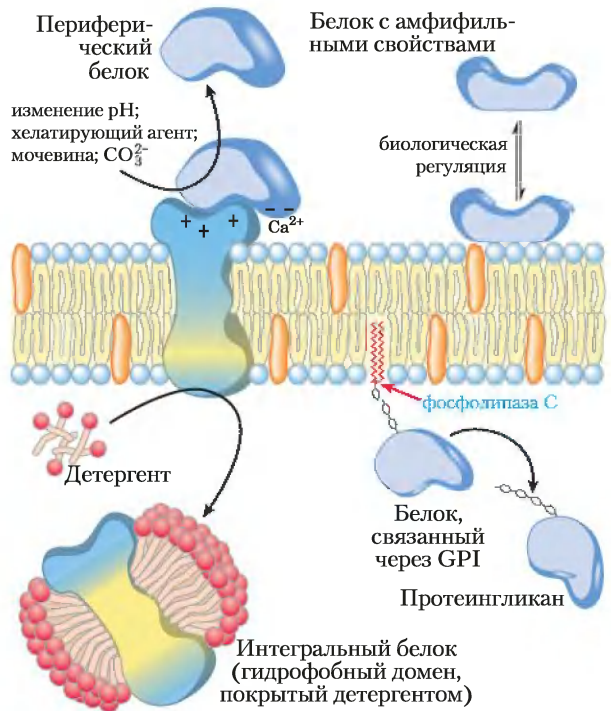


Рис. 11-6. Периферические, интегральные и амфитропные белки. Мембранные белки можно разделить в соответствии с условиями, необходимыми для их высвобождения из мембраны. Большинство периферических белков высвобождаются при изменении pH или ионной силы, удаления Ca^{2+} -хелатирующими агентами или при добавлении мочевины или карбоната. Интегральные белки экстрагируются детергентами, нарушающими гидрофобные взаимодействия с липидным бислоем и образующими мицеллоподобные кластеры вокруг отдельных белковых молекул. Интегральные белки, ковалентно связанные с мембранными липидами, такими как гликозилфосфатидилинозит (GPI, рис. 11-14), можно выделить обработкой фосфолипазой С. Амфитропные белки иногда соединены с мембраной, а иногда нет; процесс связывания регулируется, например, обратимой реакцией пальмитилирования.

внутри клетки, где он не может реагировать с реагентами, которые не проходят сквозь мембрану. И N-, и C-концевые домены содержат много полярных или заряженных аминокислотных остатков и поэтому полностью гидрофильны. Однако сегмент в центре белка (остатки 75–93) содержит много гидрофобных аминокислотных участков, и это приводит нас к заключению, что гликофорин имеет трансмембранный сегмент, расположенный так, как показано на [рис. 11-7](#).

Экспериментально выявлено, что гликофорин в мембране расположен асимметрично: N-конец всегда направлен наружу. Аналогично для других мембранных белков показано, что каждый белок специфически ориентирован в бислое: один домен трансмембранного белка всегда направлен наружу, другой — внутрь клетки. Кроме того, гликопротеины плазматической мембраны всегда располагаются таким образом, что их сахарные остатки находятся на внешней стороне клетки. Как мы увидим, асимметричное расположение мембранных белков приводит к функциональной асимметрии. Если рассмотреть строение ионного насоса, например, выясняется, что все молекулы ориентированы в мембране одинаково и, следовательно, работают в одном направлении.

Интегральные белки взаимодействуют своими гидрофобными доменами с липидами и благодаря этому удерживаются в мембране

Прочное соединение интегральных белков с мембранами достигается благодаря гидрофобным взаимодействиям между мембранными липидами и гидрофобными доменами белка. Некоторые белки содержат единственную гидрофобную последовательность в середине (как гликофорин), на N- или C-конце. У других белков есть множественные гидрофобные последовательности, каждая из которых, если она имеет α -спиральную конформацию, достаточно протяженна, чтобы пронизывать липидный бислой ([рис. 11-8](#)).

Один из изученных мембранных белков бактериородопсин содержит в центральной части своей последовательности семь сильно гидрофобных участков, пересекающих липидный бислой семь раз. Бактериородопсин работает как протонный насос и запускается под действием видимого света; его трансмембранные участки

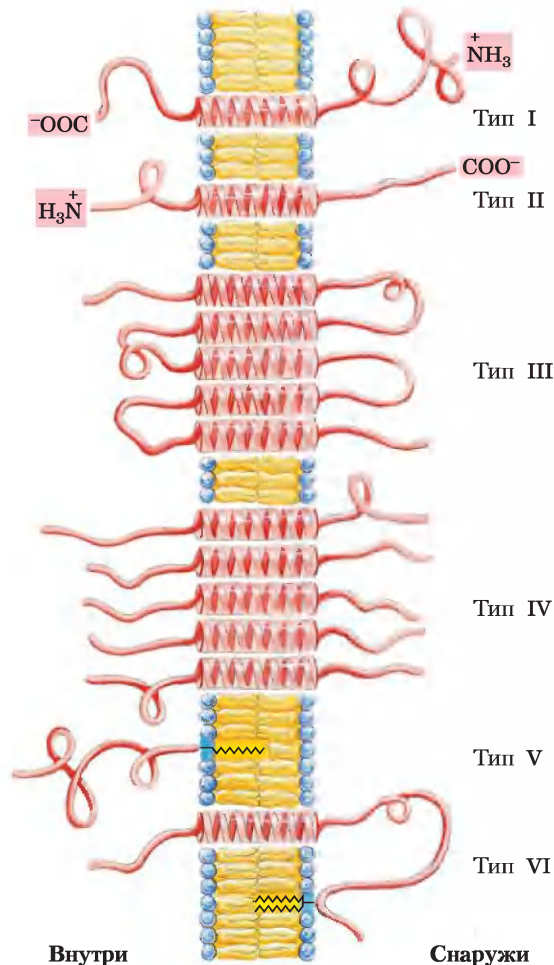


Рис. 11-8. На основании пространственного расположения белковых доменов относительно липидного бислоя белки плазматической мембраны относят к шести типам. Белки I и II типа содержат только одну трансмембранную спираль; N-концевой домен выступает из клетки у белка I, а у белка II типа этот домен находится на внутренней стороне мембраны. У белка III типа множественные трансмембранные спирали построены из одной полипептидной цепи. В белках IV типа трансмембранные домены состоят из нескольких различных полипептидов, которые, объединяясь в кластер, образуют канал через мембрану. Белки V типа удерживаются в бислое прежде всего ковалентными взаимодействиями с липидами ([рис. 11-14](#)), белки VI типа содержат и трансмембранные спирали, и липидный (GPI) якорь.

На этом рисунке и вообще во всей книге мы представляем трансмембранные белковые домены в их наиболее вероятных конформациях — как α -спирали из шести-семи витков. Иногда эти спирали показаны просто в виде цилиндров. Поскольку относительно мало мембранных белковых структур было расшифровано методом РСА, изображение внеклеточных доменов условно и необязательно соответствует истинному масштабу.

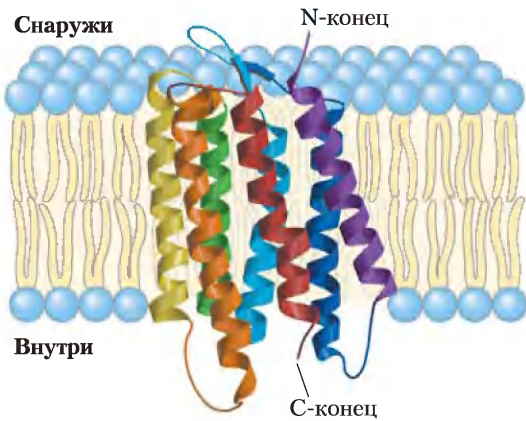


Рис. 11-9. Бактериородопсин — пронизывающий мембрану белок (PDB ID 2AT9). Единственная полипептидная цепь сложена в семь гидрофобных α -спиралей, каждая из которых пересекает липидный бислой почти перпендикулярно к плоскости мембраны. Семь трансмембранных спиралей объединяются в кластер, и пространство вокруг них и между ними заполняется ацильными цепями мембранных липидов. Светопоглощающий пигмент ретиналь (рис. 10-21) погружен глубоко в мембрану и контактирует с несколькими спиральными сегментами (не показаны). Степень окраски спиралей соответствует их гидрофильности (см. рис. 11-11, б).

плотно упакованы в клеточной мембране пурпурной бактерии *Halobacterium salinarium*. Структура бактериородопсина была установлена методом рентгеноструктурного анализа (РСА): семь α -спиралей, пронизывающих липидный бислой, крепятся на внешней и внутренней сторонах мембраны и соединены петлями неспирального строения (рис. 11-9). Аминокислотные последовательности этих семи спиралей идентифицированы, каждая содержит примерно 20 остатков гидрофобных аминокислот; такой длины как раз достаточно, чтобы пересечь бислой. Семь спиралей собраны в кластер, который ориентирован перпендикулярно бислою, тем самым в мембране построен канал для прохода протонов. Как мы увидим в гл. 12, это структурный мотив из семи пронизывающих мембрану гидрофобных спиралей встречается во всех мембранных белках, выполняющих сигнальные функции. Заякоривание белка в мембране обеспечивает гидрофобные взаимодействия между его неполярными аминокислотными остатками и ацилами жирных кислот мембранных липидов.

Исследованные с помощью методов кристаллографии мембранные белки (таким образом было установлено их молекулярное строение) часто содержат фосфолипиды; считается, что они обнаруживаются в кристаллах, поскольку находятся в исходных мембранах. Многие из молекул

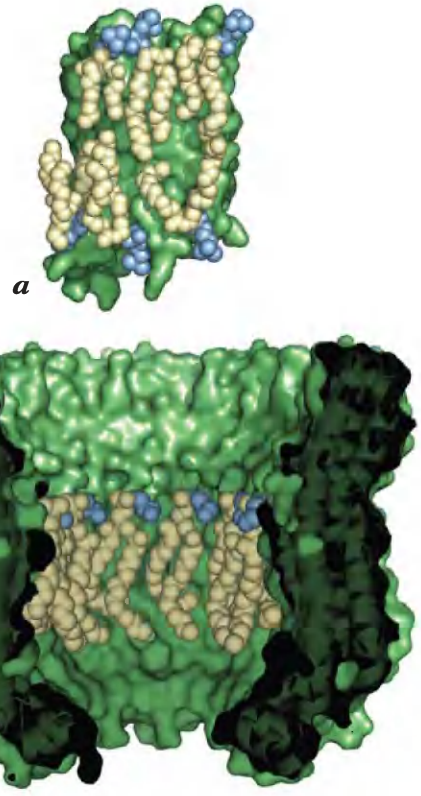


Рис. 11-10. Липидные кольца, связанные с двумя интегральными мембранными белками. а) Кристаллическая структура аквапорина овцы (трансмембранный водный канал; PDB ID 2B60), состоящего из фосфолипидной оболочки, в которой «головки» молекул (синие) располагаются на внешней и внутренней сторонах мембраны, а гидрофобные цепочки (бежевые) тесно связаны с поверхностью белка. Липид образует жировой слой вокруг белка, изображенный в виде поверхности зеленого цвета. б) Кристаллическая структура интегрального белкового комплекса Na^+ -АТФазы типа V из *Enterococcus hirae* (PDB ID 2BL2), состоит из 10 идентичных субъединиц, в каждой по четыре трансмембранные спирали, окружающие центральную полость, в которой расположен фосфатидилглицерин (ФГ). На данном рисунке пять субъединиц удалены, чтобы дать возможность читателю увидеть молекулы фосфатидилглицерина, связанные с каждой субъединицей.

фосфолипидов лежат на поверхности белков, их «головки» взаимодействуют с полярными остатками аминокислот на границе мембраны и водной среды с внутренней и внешней сторон, а боковые цепи ассоциированы с неполярными остатками. Эти **кольцевые липиды** образуют двухслойную раковину (кольцо) вокруг белка, ориентированную приблизительно так, как и положено фосфолипидам в бислое (рис. 11-10). Другие фосфолипиды были обнаружены на границе субъединиц в мультисубъединичных мембранных белках, где они формировали «уплотнение из смазки». Кроме того, фосфолипиды могут быть глубоко внедрены в мембранные белки, обычно их «головки» находятся под уровнем мембраны. Например, у сукцинатдегидрогеназы (комплекс II, встречается в митохондриях; см. рис. 19-10) есть несколько глубоко утопленных молекул фосфолипидов.

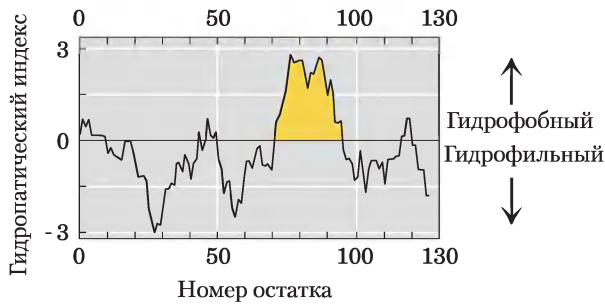
Трехмерную структуру мембранного белка можно предсказать по его последовательности

Обычно определение трехмерной структуры (топологии) мембранного белка — гораздо более сложная задача, чем определение аминокислотной последовательности секвенированием белка или его гена. Известны тысячи аминокислотных последовательностей мембранных белков, однако с помощью РСА или ЯМР было установлено гораздо меньше трехмерных структур. Присутствие непрерывных последовательностей из более чем 20 гидрофобных остатков в мембранном белке принято считать доказательством того, что эти последовательности погружены в липидный бислой, где они работают как гидрофобные якоря или образуя трансмембранные каналы. Практически каждый интегральный белок имеет по крайней мере одну такую последовательность. Если так же рассуждать в случае геномных последовательностей, то окажется, что у многих видов от 20% до 30% всех белков — интегральные мембранные белки.

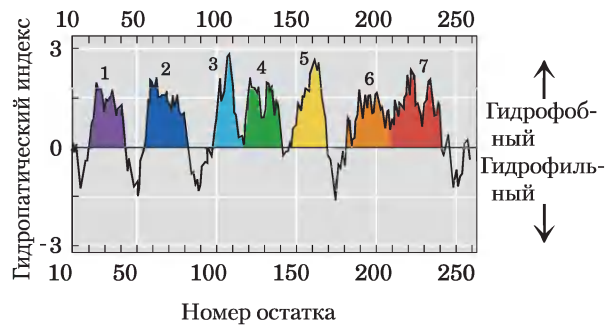
Какие можно сделать предсказания относительно вторичной структуры интегральных белков, которые пересекают мембрану? α -Спиральная последовательность из 20–25 остатков имеет длину как раз достаточную, чтобы пронизывать всю толщину (30 Å) липидного бислоя (напомним, что длина α -спирали составляет 1,5 Å (0,15 нм) на один аминокислотный остаток). Полипептидная цепь, окруженная липидами, не

имеет возможности образовать водородные связи с молекулами воды и стремится перейти к структуре α -спирали или β -слоя, где число водородных связей максимально. Если боковые цепи всех аминокислот в спирали неполярны, гидрофобные взаимодействия с окружающими липидами будут еще сильнее стабилизировать спираль.

Существует несколько простых методов анализа аминокислотных последовательностей, дающих возможность достаточно точно предсказать вторичную структуру трансмембранных белков. Относительную полярность каждой аминокислоты определяют экспериментально, измеряя изменение свободной энергии, сопровождающее перемещение аминокислотной боковой цепи из гидрофобного растворителя в воду. Энергетика этого процесса, которую можно выразить через **индекс гидрофобности** («гидропатический» индекс) для данной аминокислотной последовательности (табл. 3-1), колеблется в пределах от очень экзергонической для заряженных или полярных остатков вплоть до очень эндергонической для аминокислот с ароматическими или алифатическими углеводородными боковыми цепями. Общая гидрофобность последовательности аминокислот оценивается путем суммирования свободных энергий переноса аминокислотных остатков в последовательности. Чтобы проверить полипептидную последовательность на наличие доменов, пронизывающих мембрану, надо рассчитать индекс гидрофобности последовательности определенного размера — в интервале от 7 до 20 остатков, — называемой окном. Для окон из семи остатков, например 1–7, 2–8, 3–9 и т. д., индексы гидрофобности наносят на график, как показано на рис. 11-11 (в каждом окне выбрана середина окна, например остаток 4 для интервала 1–7). Область, содержащая больше чем 20 остатков с высоким индексом гидрофобности, считается трансмембранным доменом. Когда последовательности мембранных белков с известной трехмерной структурой сканируют таким образом, обнаруживается достаточно хорошее соответствие между предсказанным и известным трансмембранными доменами. С помощью анализа гидрофобности можно предсказать наличие единственной гидрофобной спирали в гликофорине (рис. 11-11, а) и семи трансмембранных доменов в бактериородопсине (рис. 11-11, б), что соответствует результатам экспериментов.



а Гликофорин



б Бактериородопсин

Рис. 11-11. Профили гидрофобности. Индекс гидрофобности (табл. 3-1) отложен напротив номеров остатков двух интегральных белков. Индекс гидрофобности для каждого аминокислотного остатка в последовательности определенной длины (окна) используется для расчета средней гидрофобности остатков этого окна. По оси абсцисс — номер остатка в середине окна. а) Гликофорин эритроцитов человека содержит единственную гидрофобную последовательность между остатками 75 и 93 (желтый цвет); ср. с рис. 11-7. б) По данным различных методов, у бактериородопсина семь трансмембранных спиралей (рис. 11-9) и семь гидрофобных областей. Заметим, однако, что в области доменов 6 и 7 профиль гидрофобности допускает двоякое толкование. Исследования подтвердили, что в этой области два трансмембранных домена.

На основе аминокислотных последовательностей и профилей гидрофобности можно предположить, что многие транспортные белки, описанные в этой главе, содержат множественные погруженные в мембрану спиральные участки, иными словами, они принадлежат к интегральным белкам типа III или IV (рис. 11-8). Если результаты согласуются с топологией белка (как описано для гликофорина и бактериородопсина),

вероятность того, что гидрофобные области представляют собой именно пересекающие мембрану домены, существенно возрастает.

Еще одним замечательным качеством многих трансмембранных белков, структура которых расшифрована, является присутствие остатков Туг и Тгр на поверхности раздела между липидом и водой (рис. 11-12). Боковые цепи этих остатков служат, по всей видимости, якорями на мембране, способными одновременно взаимодействовать с центральной липидной фазой и водными фазами на каждой стороне мембраны. Еще одно общее наблюдение о расположении аминокислотных остатков относительно двойного липидного слоя состоит в следующем: положительно заряженные остатки Lys, His и Arg в мембранных белках чаще всего встречаются на цитоплазматической стороне мембраны (правило «положительные остатки — внутри»).

Не все интегральные мембранные белки составлены из трансмембранных α -спиралей. Другим структурным мотивом, общим для мембранных белков, является β -цилиндр (рис. 4-17, г), в котором 20 или больше трансмембранных доменов формируют β -слои, выстраивающиеся в виде цилиндра (рис. 11-13). Те же самые факторы, которые благоприятствуют образованию α -спирали в гидрофобном окружении липидного бислоя, стабилизируют и β -цилиндры. Когда нет молекул воды для образования водородной связи с карбонильным кислородом или азотом пептидной связи, наиболее стабильную конформацию обеспечивает максимально возможное число водородных связей между цепочками. В плоских β -слоях водородными связями связаны не все атомы, которые способны к их образованию, и β -слои, как правило, не обнаружены в мембранных белках; β -цилиндры допускают образование всех возможных водородных связей и характерны для мембранных белков. **Порины** — белки, которые позволяют некоторым полярным веществам пересекать наружную мембрану грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, содержат многоцепочечные β -цилиндры, формирующие полярный трансмембранный коридор.

Полипептиды чаще принимают β -конформацию, чем α -спираль; для пересечения мембраны в β -конформации достаточно от семи до девяти остатков. Напомним, что в β -конформации переменные части отходят поочередно то вверх,

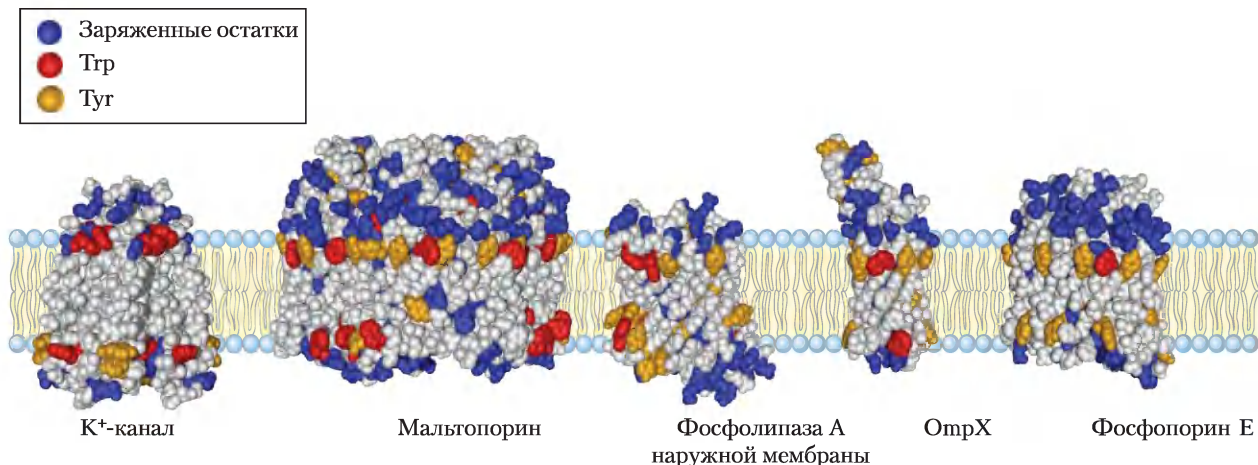


Рис. 11-12. Остатки Тир и Трп мембранных белков, образующих кластеры на поверхности раздела вода–липид. По данным рентгеноструктурного анализа была рассчитана структура этих пяти интегральных мембранных белков. K^+ -канал (PDB ID 1BL8) из *Streptomyces lividans* (рис. 11-48); мальтопорин (PDB ID 1AF6), фосфолипаза А внешней мембраны (PDB ID 1QD5), OmpX (PDB ID 1QJ9) и фосфорин Е (PDB ID 1PH0) — белки наружной мембраны *E. coli*. Остатки Тир (оранжевый цвет) и Трп (красный) обнаруживаются преимущественно в тех местах, где неполярная область ацильных цепей входит в контакт с областью полярных головок. Заряженные остатки (Lys, Arg, Glu, Asp) окрашены в голубой цвет; они обнаруживаются почти исключительно в водных фазах.

то вниз (рис. 4-6). В β -структурах мембранных белков каждый второй остаток в пронизывающей мембрану домене гидрофобный и взаимодействует с липидным бислоем; ароматические переменные части остатков обычно находятся на границе раздела липид–белок. Другие остатки могут быть или не быть гидрофильными. В случае

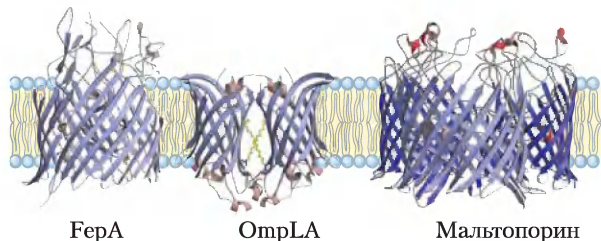


Рис. 11-13. Мембранные белки с β -цилиндрической (бочкообразной) структурой. В плоскости мембраны показаны три белка наружной мембраны *E. coli*. Белок FerA (PDB ID 1FER), участвующий в обмене железа, содержит 22 пересекающих мембрану β -цепочки. Белок OmpLA (из PDB ID 1QD5), фосфолипаза, — β -цилиндр из 12 складок (в мембране существует в виде димера). Мальтопорин (из PDB ID 1MAL), переносчик мальтозы, — тример, каждый мономер которого образует 16 β -складок.

белков с β -структурными мотивами для предсказания наличия трансмембранных доменов профили гидрофобности непригодны. Однако поскольку база данных, содержащая такие мотивы, увеличивается, предсказания трансмембранных β -конформаций, основанные на аминокислотной последовательности, становятся осуществимыми. Например, на основании анализа последовательности было правильно предсказано, что ряд мембранных белков граммотрицательных бактерий (рис. 11-13) содержат β -цилиндры.

Ковалентно связанные липиды удерживают некоторые мембранные белки

Некоторые мембранные белки ковалентно связываются с липидами (с одним или более) нескольких типов: с длинноцепочечными жирными кислотами, изопреноидами, стеринами или гликозилированными производными фосфатидилинозита (GPI; рис. 11-14). Эти липиды служат гидрофобным якорем, включенным в липидный бислой, благодаря которому белок удерживается на поверхности мембраны. Сила гидрофобного взаимодействия между бислоем и углеводородной

цепочкой, связанной с белком, может оказаться недостаточной для того, чтобы надежно закорить белок, но у многих белков есть не один связывающий липидный участок. Другие взаимодействия, такие как ионное притяжение между положительно заряженными остатками Lys в белке и отрицательно заряженными «головками» липидов, вероятно, тоже вносят свой вклад в стабилизацию соединения. Связь этих липид-связанных белков с мембраной, конечно, слабее, чем у интегральных мембранных белков, по крайней мере, в некоторых случаях она легко рвется. Однако при обработке карбонатами щелочных металлов GPI-связанные белки не высвобождаются, таким образом, их можно считать интегральными.

Помимо простого закоривания белка на мембране, липид может играть и специфическую роль. В плазматической мембране белки с GPI-якорями находятся исключительно на внешней стороне мембраны и образуют скопления в определенных участках, как мы увидим ниже (с. 543–546), в то время как другие связанные с липидами белки (с присоединенными фарне-

зильными или геранилгеранильными группами; рис. 11-14) присутствуют только на внутренней стороне. В вытянутых эпителиальных клетках (таких как эпителиальные клетки кишечника; см. рис. 11-44), в которых апикальная и базальная поверхности выполняют разные функции, GPI-связанные белки направляются именно к апикальной поверхности. Присоединение специфического липида к вновь синтезированному мембранному белку, таким образом, управляет локализацией этого белка.

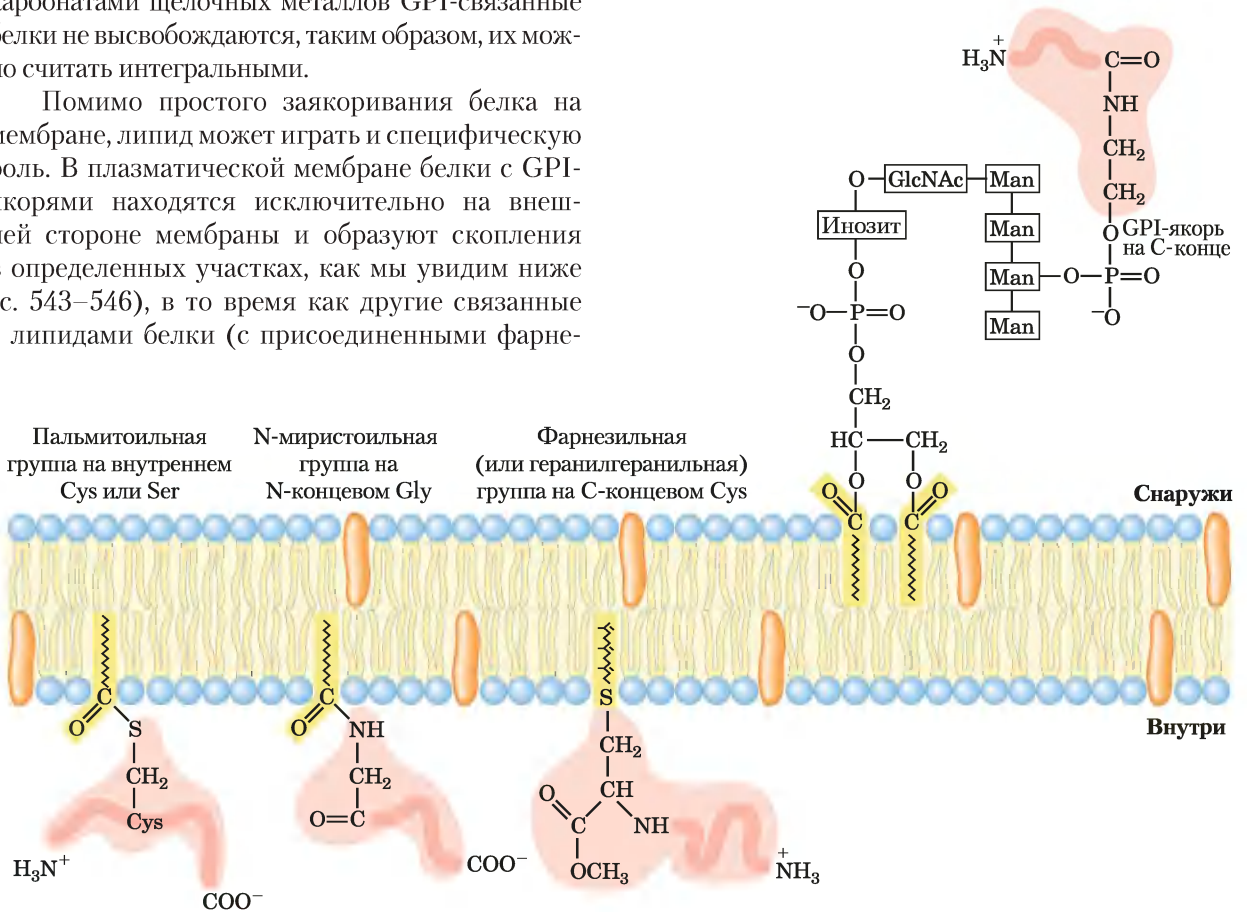


Рис. 11-14. Мембранные белки, связанные с липидами. Ковалентно связанные липиды закоривают мембранные белки в липидном бислое. Пальмитоильная группа связана тиоэфирной связью с остатком Cys; N-миристоильная группа обычно присоединяется к Gly на N-конце; фарнезильная и геранилгеранильная группы, связанные с остатками Cys на C-конце, являются изопреноидами, содержащими 15 и 20 атомов углерода соответственно. Эти три липид-белковых ансамбля находятся только на внутренней стороне плазматической мембраны. Гликозилфосфатидилинозитные (GPI) якоря представляют собой производные фосфатидилинозита, в котором инозит несет короткий олигосахарид, ковалентно присоединенный к C-концевому остатку белка через фосфоэтаноламин. GPI-связанные белки всегда расположены на внешней стороне плазматической мембраны.

Краткое содержание раздела 11.1

СОСТАВ И СТРОЕНИЕ МЕМБРАН

- Биологические мембраны определяют границы клеток, делят клетки на дискретные компартменты, организуют сложные последовательности реакций и действуют в процессах приема сигналов и превращений энергии.
- Мембраны построены из липидов и белков в разных комбинациях, характерных для каждого вида, типа клеток и органелл. Жидкостно-мозаичная модель описывает свойства, общие для всех биологических мембран. Основной структурной единицей мембран является липидный бислой.
- Периферические мембранные белки не жестко связаны с мембраной посредством электростатических взаимодействий и водородных связей или с помощью ковалентно присоединенных липидных якорных молекул. Интегральные белки прочно связываются с мембраной с помощью гидрофобных взаимодействий между липидным бислоем и неполярными остатками аминокислот, которые экспонированы на поверхности белковой молекулы. Амфифильные белки связываются с мембраной обратимым образом.
- Многие мембранные белки пронизывают липидный бислой несколько раз, при этом гидрофобные последовательности примерно из 20 аминокислотных остатков образуют трансмембранные α -спирали. Для интегральных мембранных белков также характерны многоцепочечные β -цилиндры. Остатки Туг и Тгр трансмембранных белков, как правило, находятся на границе липид–вода.
- Существует специфичность расположения включенных в мембрану липидов и белков на той или иной стороне мембраны. Таким образом, мембраны структурно и функционально асимметричны. Многие мембранные белки содержат ковалентно связанные олигосахариды. Гликопротеины плазматической мембраны всегда ориентированы так, что несущий углевод домен находится на внешней стороне мембраны.

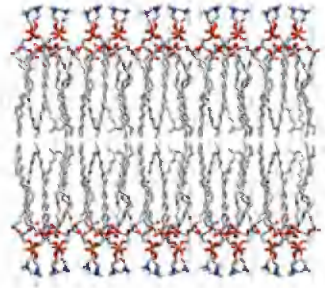
11.2. Динамика мембран

Одно из поразительных свойств всех биологических мембран — их пластичность, т. е. способность изменять форму без потери целостности и образования течи. Это обусловлено наличием нековалентных взаимодействий между липидами в бислое и возможностью движения отдельных молекул липидов, поскольку они связаны друг с другом нековалентно. Теперь обратимся к динамике мембран: движениям мембраны и промежуточным структурам, которые могут при этом возникать.

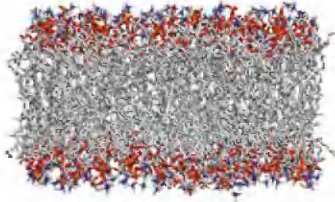
Ацильные группы внутри бислоя упорядочены в разной степени

Хотя структура липидного бислоя весьма стабильна, отдельные молекулы фосфолипидов и стеринов обладают некоторой свободой движения (**рис. 11-15**). Структура и стабильность липидного бислоя зависят от присутствующих липидов и меняются при изменении температуры. При температурах ниже физиологических липиды в бислое образуют полутвердую фазу — **гель**, в котором все движения отдельных молекул липидов строго ограничены: в этом случае говорят, что бислой находится в паракристаллическом состоянии (**рис. 11-15, а**). При температурах выше физиологических углеводородные цепи жирных кислот находятся в постоянном движении, обусловленном вращением вокруг углерод-углеродных связей длинных ацильных боковых цепей. В этом **жидко-разупорядоченном** (или жидком) состоянии (**рис. 11-15, б**) внутренняя область бислоя напоминает море из находящихся в постоянном движении липидов. При промежуточных температурах липиды существуют в **жидко-упорядоченном** состоянии; здесь в меньшей степени проявляется тепловое движение в ацильных цепях липидного бислоя, но латеральное движение еще происходит. Эти различия в состоянии бислоя легко наблюдать в липосомах, сформированных из липидов одного типа, но биологические мембраны содержат много липидов с разнообразными ацильными цепями и поэтому не демонстрируют резких фазовых переходов при изменении температуры.

а
Паракристаллическое состояние (гель)



б
Жидкое состояние



Нагревание вызывает
тепловое движение
боковых цепочек
(переход гель → жидкость)

При физиологических температурах (20–40 °С) длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты (такие как 16:0 и 18:0) хорошо упаковываются в жидко-упорядоченную структуру, но изгибы в ненасыщенных жирных кислотах препятствуют

Рис. 11-15. Два состояния липидов бислоя. а) В паракристаллическом состоянии (фазе геля) полярные «головки» равномерно выстроены на поверхности, а ацильные цепи почти неподвижны и упакованы в регулярную геометрическую структуру. б) В жидко-неупорядоченном (жидком) состоянии ацильные цепи в большей степени подвержены тепловому движению и не имеют регулярной организации. Промежуточным между этими крайними состояниями является жидко-упорядоченное состояние, при котором отдельные фосфолипидные молекулы могут диффундировать латерально, но ацильные группы остаются вытянутыми и более или менее упорядоченными.

такой упаковке (см. рис. 10-2), создавая благоприятные условия для жидко-неупорядоченного состояния. Тот же эффект оказывают ацильные группы с более короткими цепочками. Содержание стерина в мембране (которое существенно различается для разных организмов и органелл; табл. 11-1) — другой важный фактор, определяющий фазовое состояние липидов. Жесткая планарная структура стероидного ядра, внедренная между жирными ацильными боковыми цепями, уменьшает свободу вращения соседних жирных ацильных цепей вокруг углерод-углеродных связей, заставляя ацильные цепи принять полностью вытянутую конформацию. Таким образом, присутствие стерина уменьшает текучесть бислоя, благоприятствуя тем самым жидко-упорядочен-

Таблица 11-2 Жирнокислотный состав клеток *E. coli*, культивированных при разных температурах

	Содержание жирных кислот, %*			
	10 °С	20 °С	30 °С	40 °С
Миристиновая кислота (14:0)	4	4	4	8
Пальмитиновая кислота (16:0)	18	25	29	48
Пальмитолеиновая кислота (16:1)	26	24	23	9
Олеиновая кислота (18:1)	38	24	30	12
Гидроксимиристиновая кислота	13	10	10	8
Относительное содержание**, насыщенные кислоты/ненасыщенные кислоты	2,9	2,0	1,6	0,38

Источник: Marr, A. G. & Ingraham, J. L. (1962) Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **84**, 1260.

* Точный жирнокислотный состав зависит не только от температуры, но и от стадии роста и состава среды культивирования.

** Отношение суммарного содержания кислот (16:1) + (18:1) к суммарному содержанию кислот (14:0) + (16:0). Гидроксимиристиновая кислота не учитывалась.

ной фазе, и увеличивает толщину липидного монослоя (как описано ниже).

При росте в разных условиях клетки регулируют свой липидный состав для достижения постоянной текучести мембраны. Например, бактерии, когда их культивируют при низкой температуре, синтезируют больше ненасыщенных жирных кислот и меньше насыщенных, чем при повышенных температурах (табл. 11-2). В результате такой регуляции состава липидов мембраны бактерий, культивируемых как при высокой, так и при низкой температуре, имеют примерно одинаковую степень текучести.

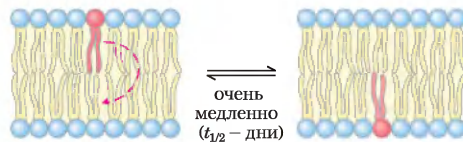
Для движения липидов через бислой необходим катализ

При физиологической температуре диффузия молекул липидов от одного монослоя к другому («флип-флоп»; рис. 11-16, а) в большинстве мембран либо вообще не случается, либо ее скорость очень низка, а вот латеральная диффузия в плоскости двойного слоя происходит очень быстро (рис. 11-16, б). Для движения через бислой необходимо, чтобы полярная или заряженная «головка» покинула свое водное окружение и перешла в гидрофобное внутреннее пространство бислоя, а этот процесс требует большого положительного изменения свободной энергии. Однако существуют ситуации, когда такое движение необходимо. Например, мембранные глицерофосфолипиды синтезируются на цитоплаз-

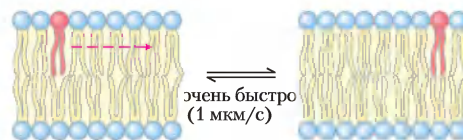
матической поверхности ЭР, а сфинголипиды синтезируются или модифицируются на люминальной поверхности. Перемещение липидов от места синтеза к месту назначения осуществляется путем флип-флоп-диффузии.

Существуют целые семейства белков, включая флиппазы, флоппазы и скрамблазы (рис. 11-16, в), которые облегчают перемещение липидов сквозь двойной слой, обеспечивая энергетически более выгодный и более быстрый путь, чем в отсутствие катализа. Сочетание асимметрии биосинтеза мембранных липидов, очень медленной некатализируемой флип-флоп-диффузии и наличия селективных энергозави-

а Некатализируемая трансбислойная (флип-флоп) диффузия



б Некатализируемая латеральная диффузия



в Катализируемый трансмембранный перенос

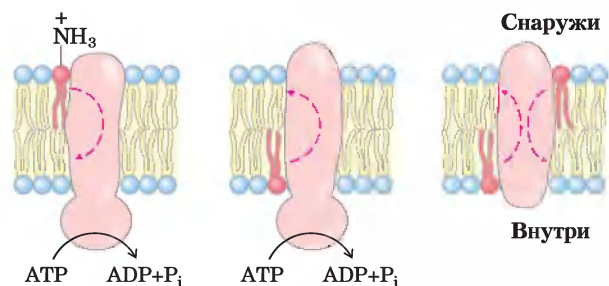


Рис. 11-16. Перемещение отдельных фосфолипидов в двойном липидном слое. а) Некатализируемое перемещение от одного монослоя к другому происходит очень медленно, в то время как латеральная диффузия (б) происходит быстро и не требует участия катализаторов. в) Три типа переносчиков фосфолипидов в плазматической мембране. Флиппазы переносят главным образом аминокислоты (фосфатидилэтаноламин (ФЭ) и фосфатидилсерин (ФС)) от внешнего (экзоплазматического) к внутреннему (цитоплазматическому) монослою; этим представителям семейства АТРаза Р-типа для проявления активности требуется АТФ. Флоппазы переносят фосфолипиды от цитозольного монослоя к внешнему монослою; они относятся к семейству АВС-транспортёров и также используют АТФ. Скрамблазы выравнивают фосфолипидный состав двух монослоев; они не используют АТФ, но активируются в присутствии ионов кальция.

Флиппаза
(АТР-аза Р-типа) переносит ФЭ и ФС от внешнего к цитоплазматическому монослою

Флоппаза
(АВС-транспортёр) переносит фосфолипиды от цитоплазматического к внешнему монослою

Скрамблаза
переносит липиды в любом направлении, восстанавливая равновесие

симых переносчиков липидов приводит к асимметрии липидного состава в слоях мембраны (рис. 11-5). Кроме вклада в эту асимметрию состава энергозависимый транспорт липидов к одной стороне двойного слоя может оказывать важное влияние — путем создания более развитой поверхности на одной из сторон двойного слоя — на возникновение изгибов мембраны, необходимых для отделения везикул.

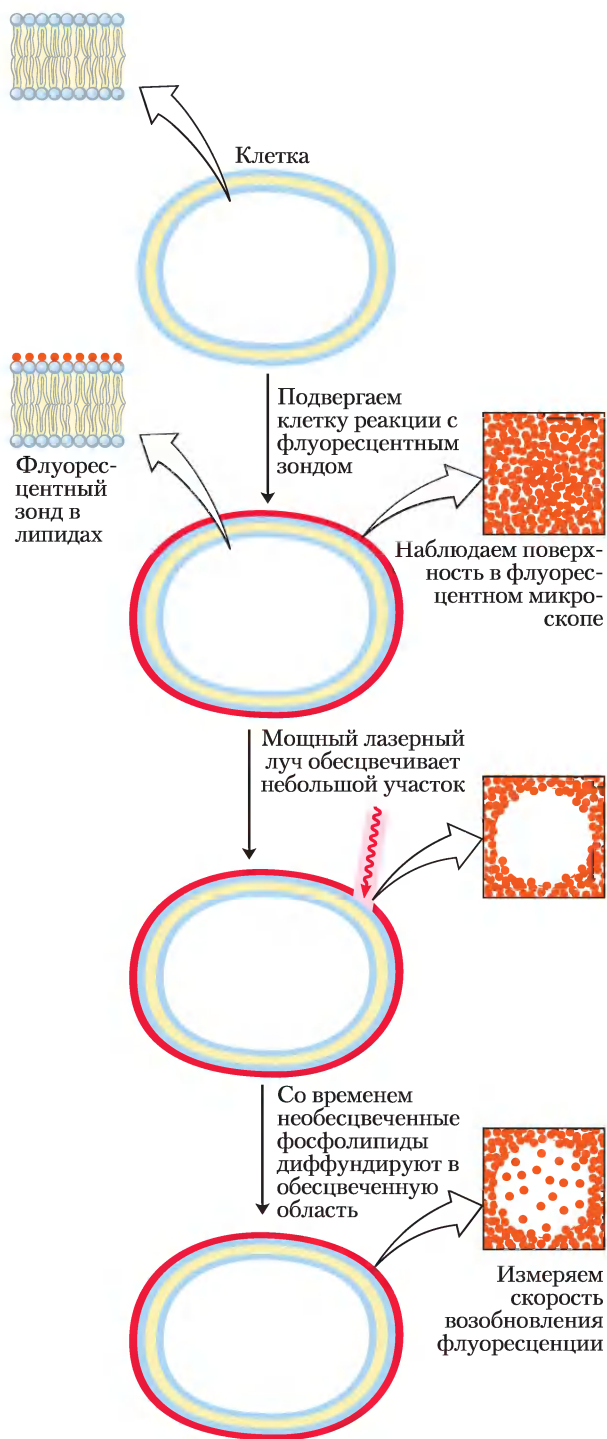
Флиппазы катализируют перенос *амино*-фосфолипидов фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина от внеклеточного монослоя к цитозольному монослою плазматической мембраны, внося свой вклад в асимметрию распределения фосфолипидов: фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин располагаются в основном на цитозольной стороне, а сфинголипиды и фосфатидилхолестерин — на внешней стороне. Локализация фосфатидилсерина не на внешней стороне мембраны имеет особый смысл: его появление на внешней стороне мембраны запускает апоптоз (программируемую клеточную смерть, см. гл. 12) и поглощение макрофагами, несущими рецепторы фосфатидилсерина. Флиппазы действуют также в ЭР, где они перемещают вновь синтезированные фосфолипиды от места синтеза на цитозольной стороне к люминальной стороне. Для перемещения одной молекулы фосфолипида флиппазы затрачивают примерно одну молекулу АТФ; по структуре и функциям эти белки родственны АТФазам Р-типа (активные переносчики; см. с. 558). **Флоппазы** перемещают фосфолипиды плазматической мембраны от цитозольной к внеклеточной поверхности и, подобно флиппазам, являются АТФ-зависимыми ферментами. Флоппазы — члены семейства АВС-транспортёров, описанного на с. 564, которые активно переносят гидрофобные субстраты через плазматическую мембрану наружу. **Скрамблазы** — это белки, которые переносят любые мембранные фосфолипиды через двойной липидный слой по градиенту концентрации (от поверхности с большей концентрацией к поверхности с меньшей концентрацией); их активность не зависит от присутствия АТФ. Действие скрамблаз приводит к контролируемому перемешиванию липидных «головок» на обеих сторонах двойного слоя. Активность этих белков сильно возрастает при увеличении концентрации ионов кальция в цитозоле, которое может быть след-

ствием активации клеток, их повреждения или апоптоза. Как отмечалось выше, появление фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны готовит клетку к апоптозу и поглощению макрофагами. Наконец, еще одну группу белков составляют транспортеры фосфатидилинозита, основная функция которых состоит в перемещении фосфатидилинозитов через двойной липидный слой; считается, что эти белки играют важную роль в передаче сигнала и мембранном транспорте.

Липиды и белки латерально диффундируют в бислое

В плазматической мембране молекулы липидов подвержены латеральной диффузии; они меняются местами с соседними молекулами, т. е. в липидном бислое происходит броуновское движение (рис. 11-16, б) с очень быстрым перемещением молекул. Например, в эритроците молекула липида диффундирует в бислое так быстро, что «проплывает» весь эритроцит за секунды. Из-за быстрой латеральной диффузии в бислое локализация там молекул случайным образом меняется за несколько секунд.

Латеральную диффузию можно продемонстрировать экспериментально. Для этого «головки» метят, например, флуоресцентной меткой и далее следят в флуоресцентный микроскоп за положением меток в бислое во времени (рис. 11-17). Описана удобная методика, где обесцвечивают интенсивным лазерным облучением небольшую область клеточной поверхности (около 5 мкм²) с флуоресцентно мечеными липидами с тем, чтобы облученное пятно больше не флуоресцировало при наблюдении в флуоресцентный микроскоп. Однако в течение миллисекунд наблюдаемый участок восстанавливает свою флуоресценцию, по мере того как «необесцвеченные» липидные молекулы диффундируют в область «обесцвеченного» пятна, а «обесцвеченные» — из него. Мерой скорости латеральной диффузии липидов является время возобновления флуоресценции после фотообесцвечивания (**FRAP** от англ. *fluorescence recovery after photobleaching*). При использовании метода FRAP было показано, что некоторые мембранные липиды диффундируют со скоростью до 1 мкм/с.



Другая методика отслеживания одиночной частицы позволяет наблюдать за движением *одной-единственной* молекулы в плазматической мембране в течение очень короткого времени. Результаты таких исследований подтверж-

Рис. 11-17. Измерение скоростей латеральной диффузии липидов методом обесцвечивания флуоресценции (FRAP). Липиды в наружном монослое плазматической мембраны метят непроникающим сквозь мембрану флуоресцентным зондом (красный цвет), так что при наблюдении с помощью флуоресцентного микроскопа поверхность мембраны равномерно флуоресцирует. Маленькое пятно обесцвечивается при интенсивном облучении лазерным лучом (эта область не флуоресцирует). Со временем меченые липидные молекулы диффундируют в обесцвеченную область, и она снова становится флуоресцирующей. Из кинетики возобновления флуоресценции определяется коэффициент диффузии меченого липида. Обычно скорости диффузии липидов высокие; липид, движущийся с этой скоростью, может «обойти» *E. coli* за 1 с. (Метод FRAP можно также использовать для измерения латеральной диффузии мембранных белков.)

дают быструю латеральную диффузию внутри малой выделенной области поверхности клетки и показывают, что движение от одной такой области к соседней области затруднено; мембранные липиды ведут себя так, как если бы они были помещены в загон, огороженный забором, через который они могли бы время от времени перескакивать (рис. 11-18).

Многие мембранные белки, по-видимому, «плавают» в море липидов. Подобно мембранным липидам, эти белки могут латерально диффундировать в бислой и находятся в постоянном движении, что подтверждается методом FRAP с флуоресцентно мечеными поверхностными белками. Некоторые мембранные белки соединяются в пэтки (от англ. *patch* — заплатка) — большие агрегаты на поверхности клетки или органеллы, в которых молекулы не могут двигаться друг относительно друга; например, ацетилхолиновые рецепторы образуют плотные пэтки на плазматической мембране нейрона в области синапсов. Другие мембранные белки закориваются на внутренних структурах, что предотвращает их свободную диффузию. В мембране эритроцита и гликофорин, и хлоридно-бикарбонатный обменник (с. 556) привязаны к спектрину, нитевидному белку цитоскелета (рис. 11-19). Обратимся к рис. 11-18 и постараемся объяснить латеральную диффузию липидных молекул. По-видимому, мембранные белки, иммобилизованные посредством связывания со спектрином, служат «изгородью», которая определяет области неконтролируемого (свободного) перемещения липидов.

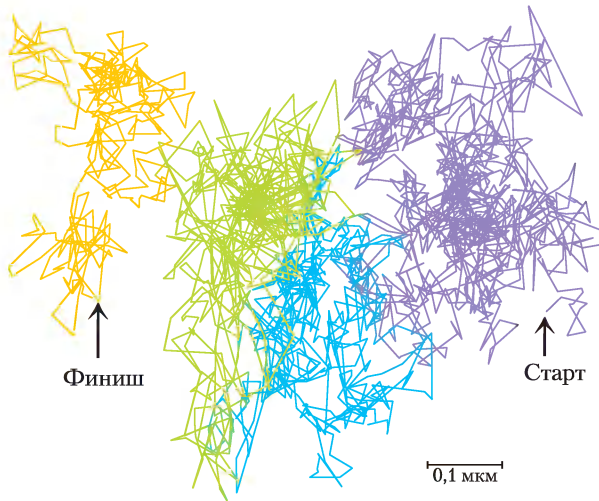


Рис. 11-18. Скачкообразная диффузия отдельных липидных молекул. С помощью флуоресцентного микроскопа сделана видеозапись движения отдельной флуоресцирующей липидной молекулы на поверхности клетки с разрешением 25 мкс (40 000 кадров в секунду). Показан трек молекулы, за которой наблюдали в течение 56 мс (всего 2250 кадров; путь начинается в фиолетовой области и продолжается через голубую, зеленую и оранжевую). Картина движения указывает на быструю диффузию внутри ограниченной области (около 250 нм в диаметре, она окрашена одним цветом) со случайными перескоками в прилежащую область. Напрашивается аналогия, что липиды словно огорожены «молекулярной изгородью», которую они время от времени перепрыгивают.

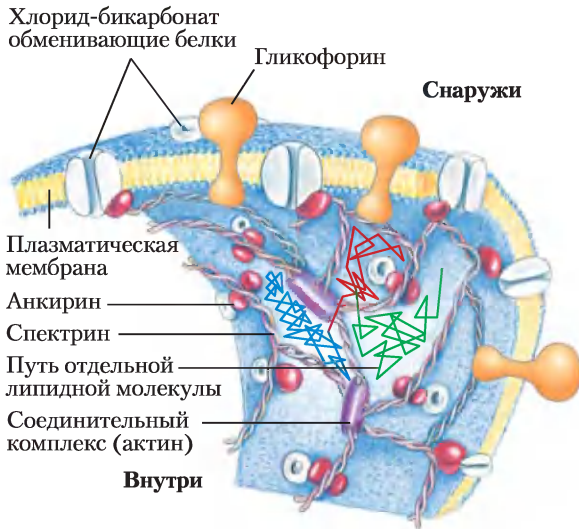


Рис. 11-19. Ограниченное движение хлоридно-бикарбонатного обменника и гликофорина в эритроцитах. Белки пронизывают мембрану и присоединяются к спектрину, белку цитоскелета, с помощью другого белка — анкирина, при этом ограничивается их способность к латеральному перемещению. Анкирин закоривается в мембране ковалентно связанной пальмитоильной боковой цепочкой (рис. 11-14). Спектрин, длинный нитевидный белок, образует поперечную сшивку с соединительным комплексом, содержащим актин. Сеть поперечно-сшитых молекул спектрин, связанных с внутренней стороной плазматической мембраны, делает мембрану устойчивой к деформации. Эта сеть закоренных мембранных белков служит «загоном» в эксперименте, показанном на рис. 11-18; движения липидов ограничены областями, содержащими связанные мембранные белки.

Сфинголипиды и холестерин объединены в кластеры — мембранные рафты

Мы видели, что диффузия мембранных липидов из одного монослоя в другой в случае, если процесс не катализируется, протекает очень медленно и что разные виды липидов плазматической мембраны распределены в мембране асимметрично (рис. 11-5). Даже внутри одного монослоя распределение липидов небеспорядочно. Гликосфинголипиды (цереброзиды и ганглиозиды), содержащие обычно длинноцепочечные насыщенные жирные кислоты, образуют во внешнем монослое промежуточные кластеры, в которых практически отсутствуют глицерофосфолипиды, имеющие, как правило, одну ненасыщенную ацильную жирнокислотную группу и более короткую насыщенную жирнокислотную группу. Длинные насыщенные ацильные группы сфинголипидов могут образовывать более компактные, более стабильные связи с протяженной системой конденсированных колец холестерина, чем более короткие, часто ненасыщенные цепи фосфолипидов. Состоящие из холестерина и сфинголипидов **микродомены** в наружном монослое плазматической мембраны, видимые с помощью атомно-силовой микроскопии (доп. 11-1), несколько толще и более упорядочены (менее жидкие), чем прилежащие микродомены, обогащенные фосфолипидами. Они с большим трудом растворяются неионными детергентами и ведут себя, как жидкость, в которой плавают достаточно упорядоченные «плоты» сфинголипидов (**рафты**), дрей-

Дополнение 11-1 МЕТОДЫ Атомно-силовая микроскопия для визуализации мембранных белков

На подвижной консоли атомно-силового микроскопа (АСМ) закреплен зонд с алмазной иглой на конце (рис. 1). Между иглой и атомами образца при их сближении возникают электростатические и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, игла (и консоль) при сканировании поверхности образца начинает двигаться, повторяя топографию поверхности (рельеф). С помощью отраженного от консоли лазерного луча можно измерить перемещение иглы даже на столь малое расстояние, как 1 \AA . В одной из конструкций АСМ давление на зонд поддерживается постоянным (по порядку величины это пиконьютоны) с помощью контура обратной связи — столик с образцами может подниматься вверх и опускаться вниз, чтобы сила не изменялась. Результат серии сканирований мембраны в направлениях x и y регистрируется в виде трехмерной «контурной карты» — профиля поверхности образца с разрешением, близким размерам атомов: $0,1 \text{ нм}$ в вертикальном $0,5\text{--}1,0 \text{ нм}$ в латеральных направлениях. По этой методике были визуализированы рафты, показанные на рис. 11-20, б.

В благоприятных случаях АСМ можно использовать для изучения мембранных белков на уровне отдельных молекул. Например, в мембранах пурпурных бактерий *Halobacterium salinarium* на АСМ были получены изображения отдельных молекул бактериородопсина, где они выглядят как высокоупорядоченные структуры (рис. 2). С помощью компьютера можно совместить несколько изображений этих (или других) реальных микрообъектов, благодаря чему добиться четкости их изображения, нивелировав сопутствующие шумы; таким образом на выходе прибора получают, например, изображение белковой молекулы с высоким разрешением (вставка на рис. 2, а).

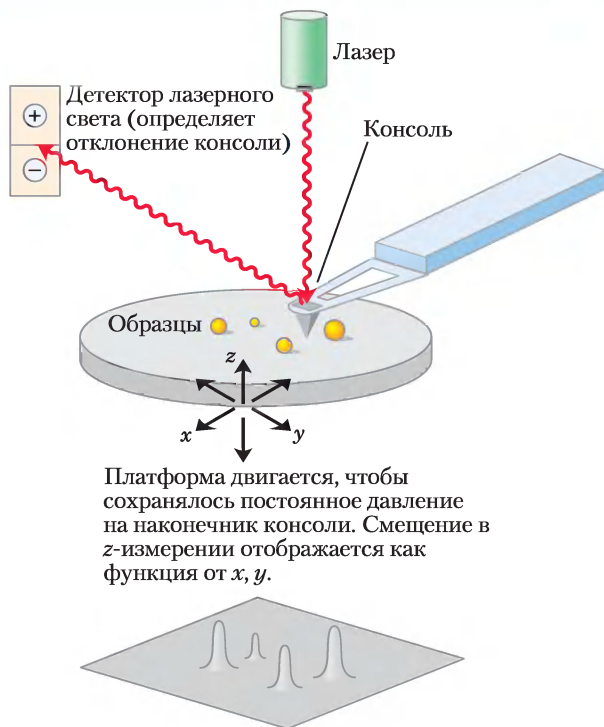


Рис. 1

В АСМ можно отчетливо увидеть домены белка аквапорина в липидном бислое, выделенном из периплазматической мембраны клеток *E. coli* (рис. 2, б). При изучении механизма транспорта протонов в хлоропластах с участием АТФ-синтазы (рис. 19-64) было показано, что в комплексе F_0 , состоящем из многих субъединиц, субъединицы расположены по кругу (рис. 2, в; видно 14 субъединиц).

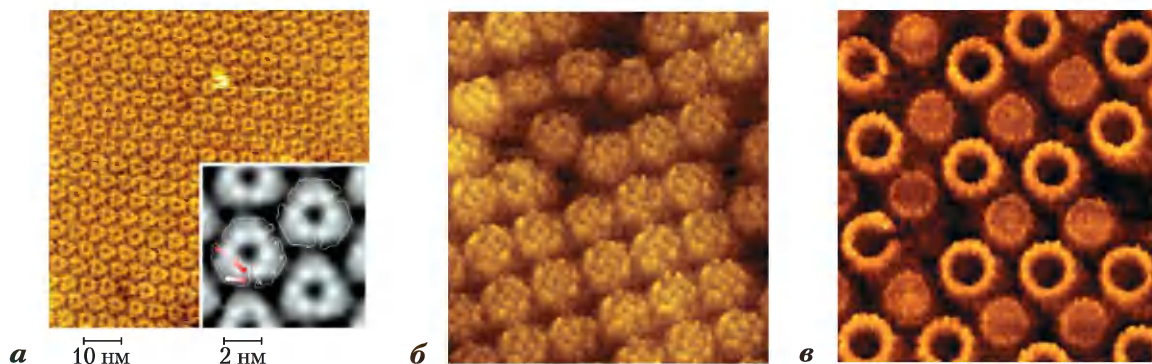


Рис. 2

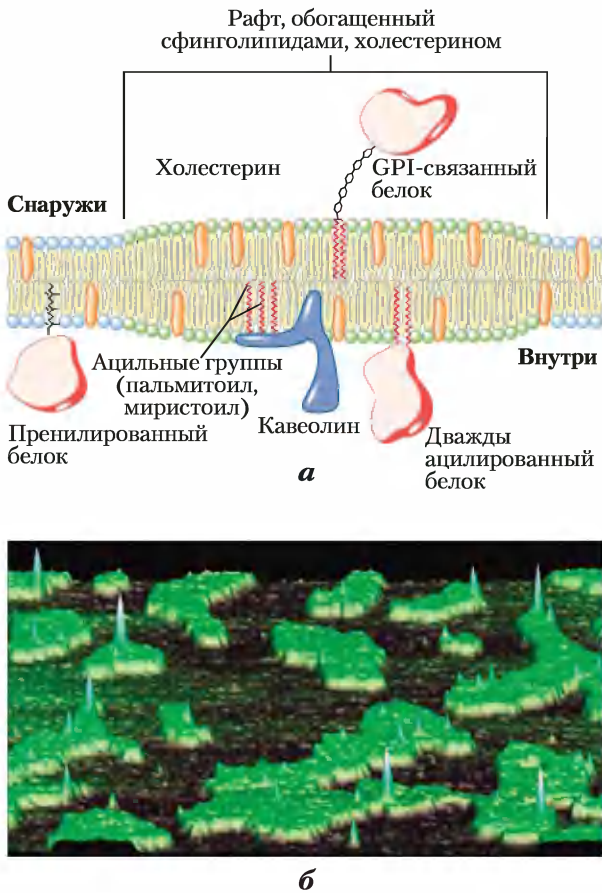


Рис. 11-20. Микродомены (рафты) в мембране. *а*) Стабильные ассоциаты сфинголипидов и холестерина во внешнем монослое образуют микродомен несколько большей толщины, чем другие области мембраны, обогащенный особыми мембранными белками. В наружном монослое таких рафтов наиболее часто обнаруживаются GPI-связанные белки, а белки с одной или несколькими ковалентно связанными длинноцепочечными ацильными группами типичны для внутреннего монослоя. Кавеолин особенно часто встречается в вогнутых внутрь рафтах, называемых кавеолами (рис. 11-21). Белки с присоединенными пренильными группами (такие как Ras; см. доп. 12-2) имеют тенденцию к выталкиванию из рафтов. *б*) В данной искусственной мембране (созданной на поверхности слюды) из холестерина, синтетического фосфолипида диолеилфосфатидилхолина и GPI-связанного белка — плацентарной щелочной фосфатазы наибольшая толщина наблюдается в области рафтов (по данным атомно-силовой микроскопии; см. доп. 11-1). Рафты (белые) выдаются из «океана» двойного липидного слоя (темное поле); пики соответствуют GPI-связанным белкам. Обратите внимание, что эти пики обнаруживаются почти исключительно в области рафтов.

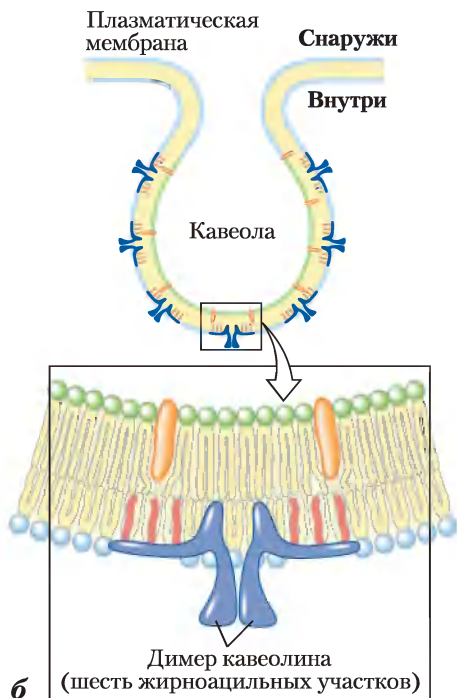
флюющие в океане совершенно не организованных жидких фосфолипидов (рис. 11-20).

Липидные рафты в высокой степени обогащены интегральными мембранными белками двух классов; одни закорены в мембране двумя ковалентно связанными длинноцепочечными насыщенными жирными кислотами (две пальмитоильные группы или пальмитоильная и миристоильная группы), другие — посредством GPI (рис. 11-14). Вероятно, эти липидные «якоря», такие как ацильные цепи сфинголипидов, образуют более стабильные связи с холестерином и длинноцепочечными ацильными группами в рафтах, чем с окружающими фосфолипидами. (Можно отметить, что другие белки, присоединенные к липидам ковалентными связями через изопренильные группы (например, через фарзинил), не обнаруживают предпочтений при закоривании на внешней поверхности сфинголипид-холестериновых рафтов, рис. 11-20, *а*.) Домены «плота» и «моря» разделены не жестко, мембранные белки могут двигаться, попадать внутрь липидных рафтов и выходить из них наружу, и все это за время порядка нескольких секунд. Но в течение нескольких микросекунд, а это время, за которое происходят многие мембранные биохимические процессы, мембранные белки могут быть де факто содержимым рафта.

Мы можем оценить долю поверхности клетки, занятой рафтами, по фракции плазматической мембраны, которая устойчива к солиобилизации детергентами. В некоторых случаях она может составлять 50%: «плоты» покрывают половину «океана» (рис. 11-20, *б*). Косвенные измерения в культуре фибробластов позволяют грубо оценить диаметр отдельного рафта в 50 нм, что соответствует пэтчу, содержащему несколько тысяч сфинголипидов и, возможно, от 10 до 50 мембранных белков. Поскольку большинство клеток экспрессируют более 50 разных видов белков плазматической мембраны, вероятно, что отдельный рафт содержит только субпопуляцию мембранных белков и что эта сегрегация мембранных белков имеет функциональное значение. Для процесса, при котором взаимодействуют два мембранных белка, их присутствие в одном рафте очень сильно увеличивает вероятность столкновения. Некоторые мембранные рецепторы и сигнальные белки, по-видимому, обособляются вместе в мембранных рафтах. Эксперименты по-



а



б

Рис. 11-21. Вогнутые изгибы мембран обусловлены кавеонином. Кавеолы — это маленькие впячивания плазматической мембраны, как видно на электронной микрофотографии поверхности адипоцита, снятого с электронноплотным маркером (а). б) Каждый мономер кавеолина содержит центральный гидрофобный домен и три длинноцепочечные ацильные группы (показаны красным), которые удерживают молекулу на внутренней стороне плазматической мембраны. Когда несколько димеров кавеолина концентрируются на мембране в пределах маленькой области (рафте) на липидном бислое появляется изгиб и образуется кавеола. Молекулы холестерина в бислое показаны оранжевым.

казывают, что передачу сигнала через эти белки можно прервать с помощью манипуляций, которые выводят холестерин из плазматической мембраны и разрушают липидные рафты.

Кавеолин — это интегральный мембранный белок, с цитоплазматической стороны плазматической мембраны содержащий два глобулярных домена, соединенных через петлеобразный ги-

дрофобный домен. Три пальмитоильных группы, присоединенных на С-конце к глобулярному домену, обеспечивают его дополнительное закоренение на мембране. Кавеолин (на самом деле это семейство родственных кавеолинов) связывает холестерин с мембраной, и присутствие кавеолина заставляет связанный с ним липидный бислой изгибаться внутрь, образуя **кавеолы** («маленькие полости») на поверхности клетки (рис. 11-21). Кавеолы — необычные рафты: в них есть *оба* монослоя — цитоплазматический монослой, из которого выступает глобулярный домен кавеолина, и внешний монослой — типичный сфинголипид-холестериновый рафт с закоренными через GPI белками. Кавеолы участвуют в разнообразных клеточных функциях, включая мембранный перенос внутри клеток и преобразование внешних сигналов в клеточные ответы. Рецепторы инсулина и других факторов роста и некоторые GTP-связывающие белки и протеинкиназы, участвующие в передаче трансмембранных сигналов, по-видимому, локализованы в рафтах и, возможно, в кавеолах. В гл. 12 мы обсудим возможную роль рафтов в передаче сигналов.

Изгибание и слияние мембран — ключевые события во многих биологических процессах

Не только кавеолин способен вызывать изгибы мембраны. Способность изгибаться лежит в основе одного из замечательных свойств биологических мембран — возможности слияния с другой мембраной без потери целостности. Хотя мембраны стабильны, но их ни в коем случае нельзя считать статичными. Внутри эндомембранной системы эукариот (которая включает ядерную мембрану, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и разнообразные малые везикулы) мембранные компартменты непрерывно реорганизуются. Везикулы отпочковываются от эндоплазматического ретикулума для того, чтобы переносить вновь синтезированные липиды и белки в другие органеллы и плазматическую мембрану. Экзоцитоз, эндоцитоз, клеточное деление, слияние сперматозоида и яйцеклетки, проникновение окруженного мембраной вируса в клетку хозяина — все эти процессы включают перестройку мембран, при которой происходит слияние двух мембранных сегментов без потери целостности (рис. 11-22). Большинство таких процессов начинается с небольшого ис-

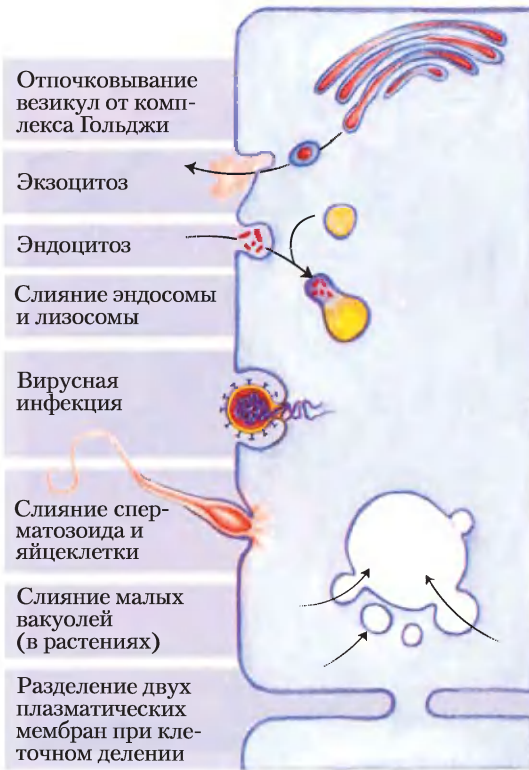


Рис. 11-22. Слияние мембран. Слияние двух мембран — центральное событие в разнообразных процессах, в которых участвуют как мембраны органелл, так и плазматические мембраны.

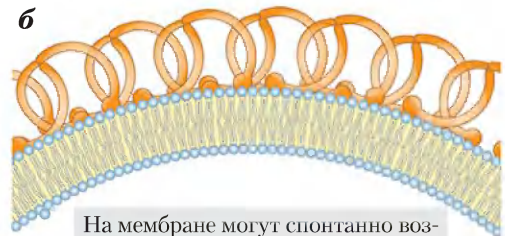
кривления мембраны. На **рис. 11-23** изображены три механизма, в соответствии с которыми может происходить искривление мембраны. Согласно первой схеме, белок изогнутой формы связывается с липидным бислоем, вызывая его искривление; это процесс зависит от энергии связывания. Во втором варианте механизма несколько белковых субъединиц соединяются в жесткий каркас — надмолекулярный комплекс, что стабилизирует спонтанно возникающие изгибы липидного бислоя. На третьей схеме показано, как при проникновении одной или нескольких гидрофобных спиралей с любой стороны липидного бислоя может происходить увеличение площади поверхности соответствующей стороны мембраны по сравнению с другой, что способствует образованию изгиба.

Специфическое слияние двух мембран требует, чтобы (1) они распознавали друг друга; (2) их поверхности могли близко сойтись, для чего необходимо удаление молекул воды, обыч-

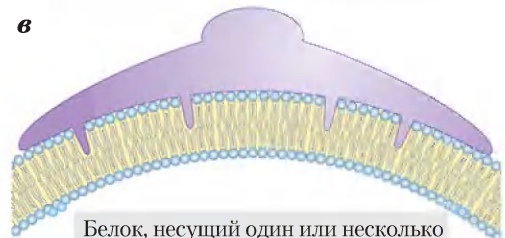
но связанной с полярными «головками» липидов; (3) чтобы их бислоенная структура локально разрушилась, обеспечивая слияние наружных монослоев каждой мембраны (полуслияние); и (4) чтобы их бислои слились, образуя один непрерывный бислой. Эндоцитоз с участием рецепторов, а также регулируемая секреция требуют, чтобы (5) процесс слияния запускался в надлежащее время или в ответ на специфический сигнал. Интегральные белки, называемые **белками слияния**, опосредуют эти события, осуществляя специфическое распознавание и кратковременную локальную деформацию бислоенной структуры, что



а
Белок изогнутой формы прочно связан на изогнутой поверхности мембраны, причем энергия связывания, которая требуется на это, должна быть минимальной.



б
На мембране могут спонтанно возникать изгибы, а при соединении нескольких белковых субъединиц образуется жесткий каркас — надмолекулярный комплекс, который и стабилизирует изгибы мембраны.



в
Белок, несущий один или несколько спиральных доменов, проникая через мембрану с любой стороны, вызывает увеличение площади соответствующего слоя мембраны, что способствует изгибу мембраны.

Рис. 11-23. Три модели механизма образования изгибов на мембране, вызванных белками.

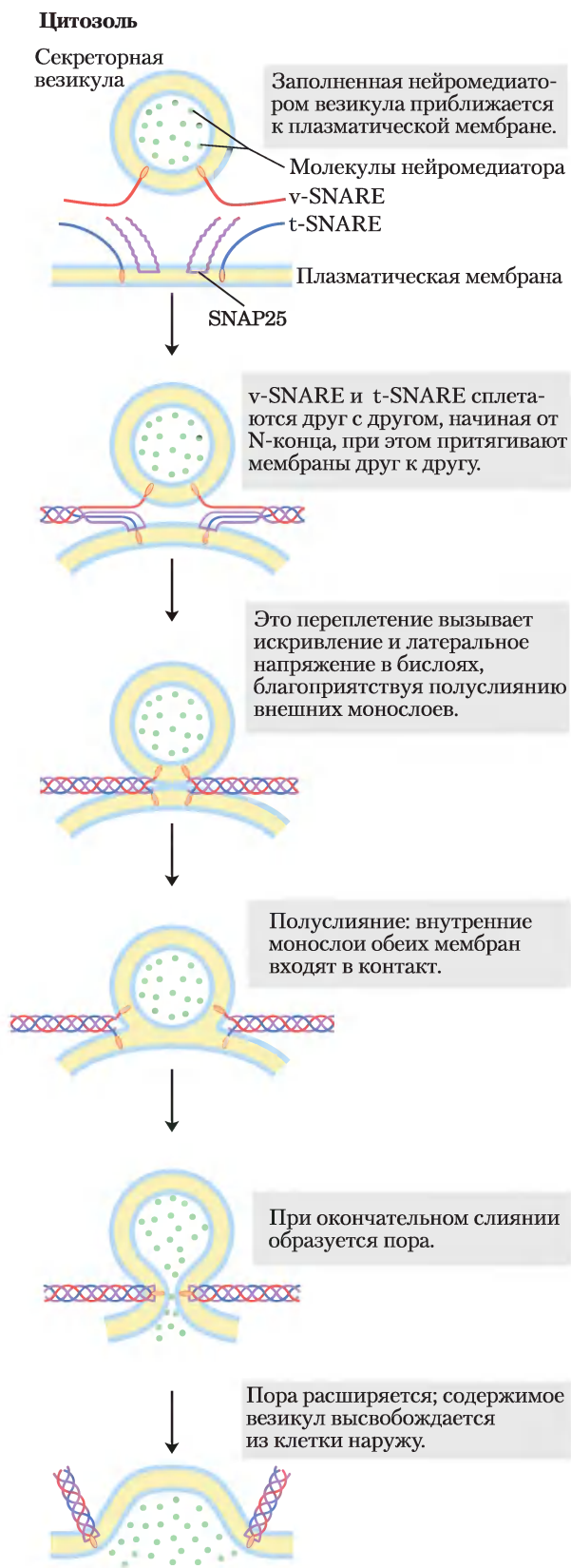


Рис. 11-24. Слияние мембран в процессе высвобождения нейромедиатора в синапсе. Мембрана секреторной везикулы (секреторного пузырька) содержит v-SNARE-синаптобrevин (красный цвет). Мембрана-мишень (плазматическая) содержит t-SNARE-синтаксин (голубой цвет) и SNAP25 (фиолетовый). Когда локальное увеличение $[Ca^{2+}]$ подает сигнал к высвобождению нейромедиатора, v-SNARE, SNAP25 и t-SNARE взаимодействуют, образуя переплетенный пучок из четырех α -спиралей. Это стягивает две мембраны вместе и локально разрушает бислои, что приводит к слиянию мембран и высвобождению нейромедиатора.

способствует слиянию мембран (заметим, что эти белки слияния не имеют никакого отношения к продуктам двух слившихся генов, называемым слитыми белками, о которых говорилось в гл. 9).

Особенно хорошо изучено слияние мембран, происходящее в синапсах, где внутриклеточные везикулы, нагруженные нейромедиаторами, сливаются с плазматической мембраной. В этом процессе участвует семейство белков, называемых SNARE (рис. 11-24). Белки SNARE цитоплазматической стороны внутриклеточных везикул называются v-SNARE; белки в мембранах-мишенях, с которыми везикулы сливаются (плазматические мембраны в случае экзоцитоза), — это t-SNARE. Кроме того, участниками событий являются два других белка, SNAP25 и SNF. В процессе слияния мембран v-SNARE и t-SNARE связываются друг с другом и претерпевают структурную перестройку, в результате которой возникают пучки длинных тонких нитей, образованных из спиралей v-SNARE и t-SNARE и двух спиралей SNAP25 (рис. 11-24). Два белка SNARE сначала взаимодействуют своими концами, затем соединяются (как застежка-«молния»), образуя пучок спиралей. Это структурное изменение притягивает две мембраны для вступления в контакт и инициирует слияние их липидных бислоев.

Комплекс SNARE и SNAP25 является мишенью действия сильного токсина *Clostridium botulinum* — протеазы, которая расщепляет специфические связи в этих белках, препятствуя передаче нервных импульсов и вызывая гибель организма. Из-за очень высокой специфичности к этим белкам очищенный токсин ботулизма используется в качестве мощного инструмента для детального изучения стадий механизма высвобождения нейромедиатора *in vivo* и *in vitro*.

Некоторые интегральные белки действуют как посредники в межклеточных взаимодействиях и в процессах адгезии

Несколько семейств интегральных белков в плазматической мембране образуют специфические места связывания между клетками или между клеткой и белками внеклеточного матрикса. **Интегрины** — это белки поверхностной адгезии, которые опосредуют ответ клетки на содержимое внеклеточного матрикса и другие клетки, не исключая и некоторые патогены. Кроме того, интегрины проводят сигнал через плазматическую мембрану в обе стороны, объединяя таким образом информацию снаружи и внутри клетки. Все интегрины представляют собой гетеродимерные белки (в них две разные субъединицы, α и β), закоренные на плазматической мембране с помощью единичной трансмембранной спирали. Большие внеклеточные домены α - и β -субъединиц соединяются, образуя специфический связывающий участок для внеклеточных белков (таких как коллаген и фибронектин), который содержит одно общее звено, определяющее связывание интегринов, — последовательность Arg-Gly-Asp (RGD). Более подробно сигнальные функции интегринов мы обсудим в гл. 12 (с. 641).

Следующий тип мембранных белков, участвующих в поверхностной адгезии, — **кадгерины**; они взаимодействуют с идентичными кадгеринами в прилегающих клетках. **Иммуноглобулин-подобные белки** могут участвовать как во взаимодействиях с идентичными им партнерами в другой клетке, так и с интегрином соседних клеток. **Селектины** содержат внеклеточные домены, которые в присутствии Ca^{2+} связывают специфические полисахариды, находящиеся на поверхности прилегающей клетки. Селектины присутствуют прежде всего в разных клетках крови и в клетках эндотелия кровеносных сосудов (рис. 7-33). Они играют существенную роль в процессах свертывания крови.

Интегральные белки участвуют во многих других клеточных процессах. Они служат транспортерами и ионными каналами (это обсуждается в разд. 11.3), функционируют как рецепторы гормонов, нейромедиаторов и факторов роста (гл. 12). Они играют центральную роль в окислительном фосфорилировании и фотосинтезе (гл. 19), в распознавании клеток в иммунной системе (клетка–клетка и антиген–клетка; гл. 5). Интегральные белки также активно участвуют в слиянии мем-

бран, которое сопровождается экзоцитоз, эндоцитоз и вход многих вирусов в клетки хозяина.

Краткое содержание раздела 11.2 ДИНАМИКА МЕМБРАН

- Липиды в биологической мембране могут существовать в жидко-упорядоченном или жидко-разупорядоченном состоянии; в последнем случае тепловое движение ацильных цепей делает внутреннюю область бислоя жидкой. На текучесть влияют температура, состав жирных кислот и содержание стероидов.
- Диффузия липидов по типу «флип-флоп» между внешним и внутренним монослоями мембраны — очень медленный процесс, за исключением тех случаев, когда его катализируют специфические флипазы, флопазы или скрамблазы.
- Липиды и белки могут двигаться латерально в плоскости мембраны, но такая подвижность ограничивается взаимодействиями мембранных белков с внутренними структурами цитоскелета и взаимодействиями липидов с липидными рафтами. Рафты, которые состоят из сфинголипидов и холестерина с включением мембранных белков, связанных через GPI или длинноцепочечные ацильные группы, выделены в особый класс липидных рафтов.
- Кавеолин — интегральный мембранный белок, который связывается с внутренним монослоем плазматической мембраны, заставляя ее искривляться с образованием кавеолы, вероятно, участвующей в мембранном транспорте и передаче сигналов.
- Интегрины — трансмембранные белки плазматической мембраны, которые служат как для связывания клеток друг с другом, так и для передачи сигналов между внеклеточным матриксом и цитоплазмой.
- Специфические белки опосредуют слияние двух мембран, которое сопровождается такими процессами, как внедрение вирусов, а также эндоцитоз и экзоцитоз.

Пассивному транспорту способствуют мембранные белки

Когда два водных компартмента, содержащих неравные концентрации растворенного вещества или иона, разделены проницаемой перегородкой — мембраной, растворенное вещество движется через мембрану по механизму **простой диффузии** от области с большей концентрацией к области с более низкой концентрацией до тех пор, пока в обоих компартментах не будет достигнута одинаковая концентрация вещества (рис. 11-26, а). Когда ионы противоположного заряда разделены мембраной, возникает трансмембранный электрический градиент — **мембранный потенциал** V_m (выражается в вольтах или милливольтгах). Этот мембранный потенциал V_m есть та сила, которая препятствует переносу ионов через мембрану, что вызвало бы рост V_m ; при этом ионы начинают двигаться так, чтобы уменьшить V_m (рис. 11-26, б). Таким образом, направление, в котором заряженное вещество спонтанно движется через мембрану, зависит и от химического градиента (различия в концентрациях вещества), и от электрического градиента (V_m). Вместе эти два фактора определяются как **электрохимический градиент** или **электрохимический потенциал**. Такое поведение веществ находится в соответствии со вторым за-

коном термодинамики: *спонтанное распределение молекул характеризуется максимальной неупорядоченностью и наименьшей энергией*.

Чтобы пересечь мембрану, т. е. липидный бислой, полярное (или несущее заряд) вещество должно не образовывать прочных связей с молекулами воды в своей гидратной оболочке, но, плохо растворяясь в гидрофобных липидах, быть способным диффундировать через липидный бислой на расстояние ~ 3 нм (~ 30 Å). Чтобы такое вещество потеряло свою гидратную оболочку и переместилось из водной среды с одной стороны мембраны через липидный бислой на другую сторону мембраны, расходуется энергия, которая выделяется при гидратации этого вещества на другой стороне мембраны. На промежуточной стадии трансмембранного транспорта в липидном слое это полярное вещество находится в переходном высокоэнергетическом состоянии, напоминающем переходное состояние в реакциях ферментативного катализа. В обоих случаях энергия переходного состояния определяет активационный барьер (энергию активации) для завершения процесса (рис. 11-27; ср. рис. 6-3). Энергия активации (ΔG^*) процесса переноса полярных и заряженных веществ в гидрофобном слое липидов настолько большая, что шансы перейти на другую сторону мембраны у них фактически отсутствуют — про-

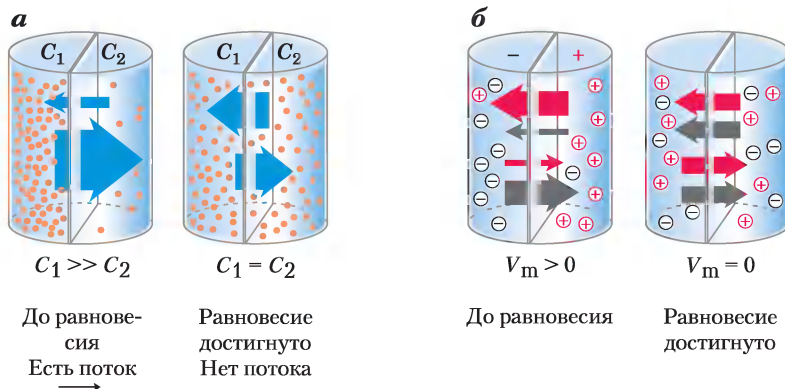


Рис. 11-26. Транспорт веществ через мембрану. а) Неполярное вещество может проходить через мембрану в направлении от высокой концентрации к низкой; процесс заканчивается установлением равновесия, когда концентрации вещества по обе стороны мембраны одинаковые. Размеры стрелок, показывающих направление переноса вещества, качественно демонстрируют скорость процесса в двух направлениях. б) Если мембрану преодолевает полярное (несущее заряд) вещество, процессом управляет не только концентрация, т. е. градиент концентрации, но и электрический потенциал на мембране V_m . Поэтому здесь процесс зависит от электрохимического потенциала и продолжается, пока электрохимический потенциал не достигнет нуля.

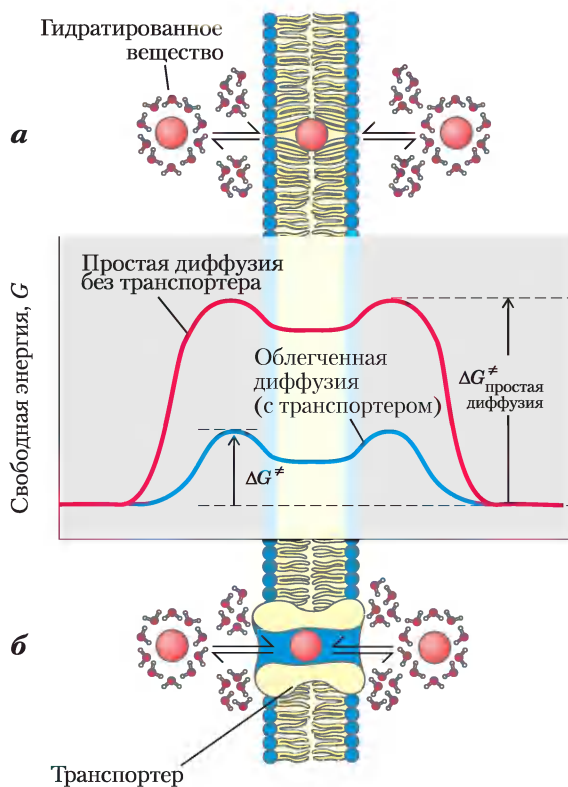


Рис. 11-27. Изменение свободной энергии при переходе гидрофильного вещества через липидный бислой биомембраны. а) При простой диффузии удаление гидратной оболочки чрезвычайно эндергоничный процесс, и энергия активации ΔG^\ddagger диффузии через бислой очень высокая. б) Белок-транспортёр уменьшает ΔG^\ddagger диффузии вещества через мембрану. Он делает это посредством нековалентных взаимодействий с дегидратированным веществом, заменяя образование водородных связей с водой и предоставляя гидрофильный трансмембранный коридор.

цесс мог бы продолжаться гораздо дольше, чем клеточный рост и клеточное деление.

Мембранные белки понижают энергию активации переноса полярных соединений и ионов, предоставляя альтернативный путь через бислой. Белки, которые осуществляют такую **облегченную диффузию (пассивный транспорт)**, не ферменты в обычном смысле; их «субстраты» перемещаются из одного компартмента в другой, но химически не изменяются. Мембранные белки, которые ускоряют движение вещества через мембрану путем облегченной диффузии, называются **транспортёрами**, или **пермеазами**.

Подобно ферментам, белки-транспортёры связываются с субстратом стереоспецифично с

образованием множественных слабых связей нековалентной природы. При этом для процесса связывания $\Delta G^\ddagger < 0$, а для процесса дегидратации (потери гидратной оболочки) $\Delta G^\ddagger > 0$. Энергия активации ΔG^\ddagger при облегченной диффузии понижается по сравнению с простой диффузией (рис. 11-27). Несколько белков-транспортёров, пронизывая липидный бислой, могут создать там трансмембранный канал, выстланный гидрофильными боковыми цепями аминокислотных остатков. Таким образом у специфического субстрата появляется альтернативный путь для перемещения через липидный бислой, не требующий растворения в гидрофобных липидах, и это еще больше уменьшает ΔG^\ddagger трансмембранной диффузии. В результате «помощи» белков-транспортёров скорость транспорта через мембрану увеличивается на несколько порядков.

Транспортёры по их структурам можно сгруппировать в суперсемейства

Из геномных исследований мы знаем, что транспортёры составляют существенную часть всех белков, кодируемых в геномах как простых, так и сложных организмов. В геноме человека, вероятно, более 1000 различных транспортёров. Транспортёры делят на две очень большие группы: переносчики и каналы (рис. 11-28). **Переносчики** связываются со своими субстратами с высокой стереоспецифичностью, катализируют транспорт от скоростей, гораздо более низких, чем скорости свободной диффузии, и являются насыщаемыми в том же смысле, что и ферменты: при некоторой концентрации субстрата дальнейшее ее увеличение не приводит к увеличению скорости транспорта. **Каналы** обычно делают

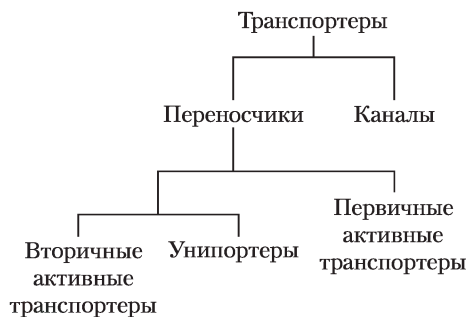


Рис. 11-28. Классификация транспортёров.

возможным трансмембранное перемещение со скоростями, на несколько порядков более высокими, чем скорости, характерные для переносчиков; такой транспорт приближается к свободной диффузии. Каналы проявляют меньшую стереоспецифичность, чем переносчики, и не являются насыщаемыми. Большинство каналов — это олигомерные комплексы из нескольких, часто идентичных, субъединиц, а почти все переносчики функционируют в виде отдельных белков. Разделение на переносчики и каналы — это самая грубая классификация транспортеров. Внутри каждой из этих категорий есть разные суперсемейства, определяемые не только по первичным последовательностям, но и по вторичной структуре. Некоторые каналы построены главным образом из спиральных трансмембранных сегментов, другие имеют структуру β -цилиндра. Некоторые переносчики просто облегчают диффузию по концентрационному градиенту; это суперсемейство **пассивных транспортеров**. **Активные транспортеры** могут перемещать субстраты через мембрану против градиента концентрации, при этом некоторые используют энергию, выделяемую непосредственно в химической реакции (первичные активные транспортеры), а другие сопрягают транспорт одного субстрата с поглощением энергии в одном направлении с транспортом другого субстрата с выделением энергии (вторичные активные транспортеры), в другом направлении. Теперь нам предстоит рассмотреть несколько хорошо изученных представителей главных суперсемейств транспортеров. В последующих главах мы снова встретимся с некоторыми из этих транспортеров при обсуждении метаболических путей, в которых они участвуют.

В эритроцитах транспортер глюкозы опосредует пассивный транспорт

Производящий энергию метаболизм в эритроцитах зависит от постоянного поступления глюкозы из плазмы крови, где поддерживается концентрация глюкозы 5 мМ. Глюкоза попадает в эритроциты путем облегченной диффузии через специфический транспортер со скоростью, которая в 50 000 раз больше, чем скорость некатализируемой диффузии. Транспортер глюкозы в эритроцитах (называемый GLUT1, чтобы от-

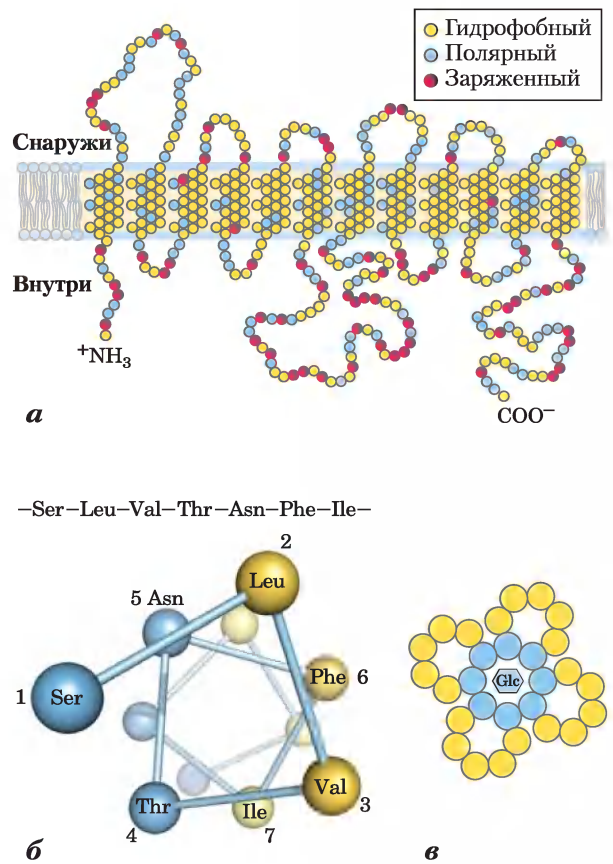


Рис. 11-29. Предполагаемая структура GLUT1. а) Трансмембранные спирали представлены как наклонные ряды из трех или четырех аминокислотных остатков, каждый ряд изображает один виток α -спирали. Девять из 12 спиралей содержат по три или более полярных или заряженных аминокислотных остатков (голубые и красные), часто разделенных несколькими гидрофобными остатками (желтые). Данное изображение не отражает трехмерную структуру. б) Проекция спирального сегмента показывает расположение полярных и неполярных остатков. Соединение остатков соответствует аминокислотной последовательности, а положение остатков по кругу — проекции спирали (напомним, что полный виток α -спирали — это 3,6 остатка). Здесь полярные остатки (голубые) находятся с одной стороны спирали, а гидрофобные (желтые) — с другой. Такая спираль обязательно амфифильная. в) Пять (или, возможно, шесть) амфифильных спиралей расположены рядом (бок об бок) и касаются друг друга, в каждой спирали поверхность, несущая заряды, обращена к оси спирали и образует цилиндрическую полость — трансмембранный канал, выстланный полярными или заряженными боковыми цепями аминокислотных остатков. Попадая в этот канал и двигаясь по нему, глюкоза получает большие возможности для образования водородных связей.

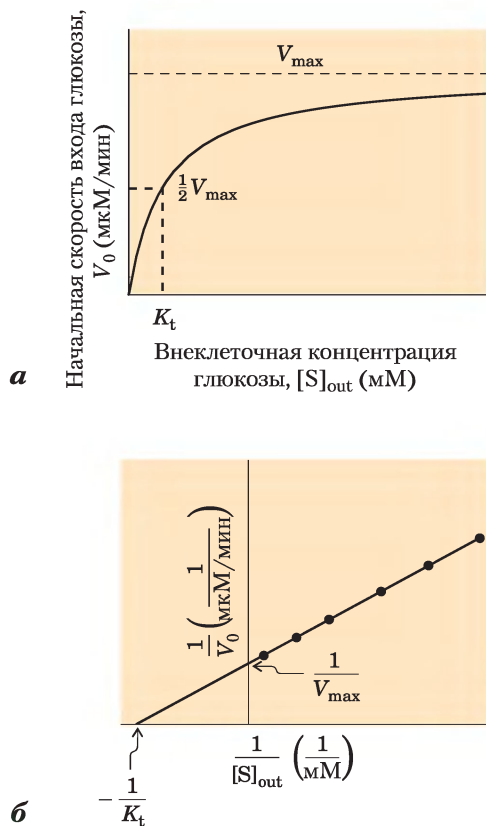


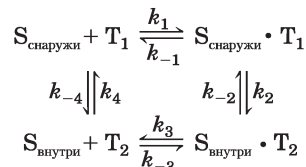
Рис. 11-30. Кинетика транспорта глюкозы в эритроциты.

а) Начальная скорость входа глюкозы в эритроцит V_0 зависит от начальной концентрации глюкозы вне клетки S_{out} (снаружи). б) График в двойных обратных координатах по данным (а). Кинетика облегченной диффузии аналогична кинетике ферментативной реакции (ср. графики рис. 6-11 и рис. 1 в доп. 6-1). Заметим, что K_t аналогична константе Михаэлиса K_M .

личать его от глюкозных переносчиков в других тканях) является интегральным белком типа III ($M_r \approx 45\ 000$) с 12 гидрофобными доменами, каждый из которых, как принято считать, образует спираль, пронизывающую мембрану. В деталях структура GLUT1 пока неизвестна, но согласно одной из правдоподобных моделей, параллельное бок о бок расположение нескольких спиралей образует трансмембранный канал, выстланный гидрофильными остатками, которые могут образовывать водородные связи с глюкозой при ее движении через канал (рис. 11-29).

Транспорт глюкозы можно описать, используя аналогию с ферментативной реакцией, в ко-

торой субстрат — глюкоза вне клетки ($S_{\text{снаружи}}$), продукт — глюкоза внутри ($S_{\text{внутри}}$), а фермент — транспортер (Т). Если скорость поглощения глюкозы определяется как функция концентрации глюкозы снаружи (рис. 11-30), результирующая кривая — гипербола, и при высокой внешней концентрации глюкозы скорость поглощения приближается к V_{max} . Формально такой процесс транспорта можно описать уравнениями



где k_1 , k_{-1} и т. д. — константы скоростей прямых и обратных реакций на каждой стадии; T_1 — конформация транспортера, открытая наружу, а T_2 — открытая внутрь. Все стадии транспорта глюкозы представлены на рис. 11-31. Поскольку каждая стадия обратима, переносчик, в принципе, способен как вводить глюкозу в клетку, так и выводить ее из клетки. Однако глюкоза всегда перемещается по градиенту своей концентрации; обычно это означает, что она поступает в клетку. Поступающая в клетку глюкоза подвергается превращениям немедленно, так что

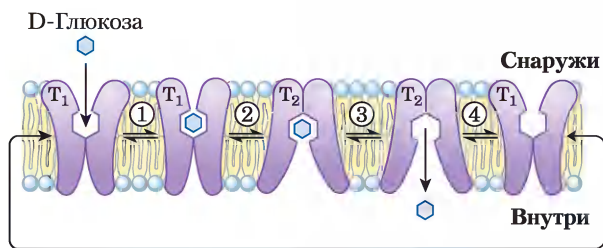


Рис. 11-31. Модель переноса глюкозы в эритроциты переносчиком GLUT1. Транспортер существует в двух конформациях: T_1 — со связывающим глюкозу сайтом, экспонированным на внешней поверхности плазматической мембраны, и T_2 — со связывающим глюкозу сайтом, расположенным на внутренней поверхности. Транспорт глюкозы протекает в четыре стадии. ① Глюкоза в плазме крови связывается со стереоспецифическим сайтом на T_1 ; это понижает энергию активации на стадии ②, где происходит изменение конформации из $S_{\text{снаружи}} \cdot T_1$ в $S_{\text{внутри}} \cdot T_2$, что влияет на трансмембранный переход глюкозы. ③ Теперь глюкоза высвобождается с T_2 в цитоплазму, и ④ транспортер снова принимает конформацию T_1 и готов переносить другую молекулу глюкозы.

ее внутриклеточная концентрация всегда поддерживается на низком уровне по сравнению с концентрацией в крови.

Уравнение скорости для транспорта глюкозы можно вывести точно так же, как для ферментативных реакций (гл. 6); при этом получается выражение, аналогичное уравнению Михаэлиса–Ментен

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]_{\text{снаружи}}}{K_t + [S]_{\text{снаружи}}} \quad (11-1)$$

где V_0 — начальная скорость накопления глюкозы внутри клетки при ее концентрации в окружающей среде $[S]_{\text{снаружи}}$, а K_t — константа, аналогичная константе Михаэлиса, характерная для транспортной системы. Это уравнение описывает *начальную* скорость, т. е. скорость при $[S]_{\text{внутри}} = 0$. Как и в случае ферментативной реакции, уравнение в двойных обратных координатах $1/V_0$ от $1/[S]_{\text{снаружи}}$ дает линейный график, откуда можем получить K_t и V_{\max} (рис. 11-30, б). Когда $[S] = K_t$, скорость поглощения составляет половину максимальной; перенос достигает половины насыщения. Концентрация глюкозы в крови 4,5–5 мМ или $\sim 3 K_t$, это позволяет с полным основанием считать, что

GLUT1 почти насыщен субстратом и работает со скоростью, близкой к V_{\max} .

Поскольку при переносе субстрата $S_{\text{снаружи}} \rightarrow S_{\text{внутри}}$ никаких химических связей не образуется и не разрушается, ни субстрат, ни продукт не становятся более стабильными, а, следовательно, процесс переноса глюкозы полностью обратим. По мере того, как $[S]_{\text{внутри}}$ приближается к $[S]_{\text{снаружи}}$, скорости входа и выхода становятся равными. Поэтому такая система не способна накапливать субстрат (глюкозу) внутри клетки в концентрациях, превышающих концентрацию снаружи; равновесные концентрации глюкозы на обеих сторонах мембраны достигаются гораздо быстрее, чем это происходило бы в отсутствие специфического транспортера. GLUT1 специфичен к D-глюкозе, $K_t \approx 1,5$ мМ. Для близких аналогов глюкозы D-маннозы и D-галактозы, которые отличаются только положением одной гидроксильной группы, K_t составляет 20 и 30 мМ соответственно; для L-глюкозы $K_t > 3\,000$ мМ. Таким образом, GLUT1 демонстрирует три характерных для пассивного транспорта свойства: высокие скорости диффузии по градиенту концентрации, насыщаемость и специфичность.

В геноме человека закодированы 12 транспортеров глюкозы, каждый имеет уникальные

Таблица 11-3 Транспортеры глюкозы, закодированные в геноме человека

Транспортер	Ткани, где экспрессируется	Ген	Роль*
GULT1	Повсеместно	<i>SLC2A1</i>	Поглощение базальной глюкозы
GULT2	Печень, островки Лангерганса поджелудочной железы, кишечник	<i>SLC2A2</i>	В печени — удаление избытка глюкозы из крови; в поджелудочной железе — регуляция высвобождения инсулина
GULT3	Головной мозг	<i>SLC2A3</i>	Поглощение базальной глюкозы
GULT4	Мышцы, жировая ткань, сердце	<i>SLC2A4</i>	Активность увеличивается инсулином
GULT5	Кишечник, яички, почки, сперма	<i>SLC2A5</i>	Первичный транспорт фруктозы
GULT6	Селезенка, лейкоциты, мозг	<i>SLC2A6</i>	Вероятно, нет транспортной функции
GULT7	Микросомы печени	<i>SLC2A7</i>	—
GULT8	Яички, бластодермический пузырек, мозг	<i>SLC2A8</i>	—
GULT9	Печень, почки	<i>SLC2A9</i>	—
GULT10	Печень, поджелудочная железа	<i>SLC2A10</i>	—
GULT11	Сердце, скелетные мышцы	<i>SLC2A11</i>	—
GULT12	Скелетные мышцы, жировая ткань, тонкий кишечник	<i>SLC2A12</i>	—

* Прочерк означает, что роль пока не установлена.



Когда переваривание богатой углеводами пищи приводит к повышенной по сравнению с нормой (~5 мМ) концентрации глюкозы между приемами пищи, избыточная глюкоза поглощается миоцитами сердечной и скелетных мышц (которые сохраняют ее в виде гликогена) и адипоцитами (которые превращают ее в триацилглицериды). Поступление глюкозы в миоциты и адипоциты опосредуется переносчиком глюкозы GLUT4. Между приемами пищи некоторое количество GLUT4 присутствует в плазматической мембране, но большая часть находится в мембранах маленьких внутриклеточных везикул (рис. 1). Инсулин, высвобождающийся из поджелудочной железы в ответ на высокий уровень глюкозы в крови, запускает движение этих внутриклеточных пузырьков к плазматической мембране, где они с ней сливаются, экспонируя таким образом молекулы GLUT4 на внешней поверхности клетки (см. рис. 12-6). По мере введения в действие все большего числа молекул GLUT4 скорость поглощения глюкозы увеличивается в 15 или более раз. Когда уровень глюкозы крови возвращается к норме, высвобождение инсулина замедляется и большинство молекул GLUT4 удаляются из плазматической мембраны и сохраняются в везикулах.

При сахарном диабете I типа (юношеская форма) неспособность высвобождать инсулин (и соответственно приводить в действие транспортеры глюкозы)

кинетические свойства, картину распределения в тканях и функцию (табл. 11-3). В печени GLUT2 выводит глюкозу из гепатоцитов для пополнения ее уровня в крови, когда уже использован печеночный гликоген. Для GLUT2 $K_t \approx 66$ мМ, и в соответствии с этим он может отвечать на увеличение уровня внутриклеточной глюкозы (образовавшейся при распаде гликогена) увеличением ее транспорта из клетки. В скелетных и сердечной мышцах, а также в жировой ткани работает другой транспортер глюкозы — GLUT4 ($K_t = 5$ мМ), его активность стимулируется инсулином: его активность увеличивается, когда высвобождение инсулина сигнализирует о высокой концентрации глюкозы в крови, вследствие этого увеличивается скорость поглощения глюкозы мышечной или жировой тканью (в доп. 11-2 описаны некоторые дефекты этого транспортера).

приводит к снижению скорости поступления глюкозы в мышцы и жировую ткань. Одним из следствий этого является продолжительный период с высоким уровнем глюкозы в крови после приема богатой углеводами пищи. Это лежит в основе теста на толерантность к глюкозе для диагностики диабета (гл. 23).

Проницаемость для воды эпителиальных клеток, выстилающих почечную собирательную трубочку, обусловлена наличием аквапорина (AQP-2) в апикальных плазматических мембранах (обращенных в полость канала). Антидиуретический гормон (АДГ) регулирует удержание воды, мобилизуя молекулы AQP-2, сохраняемые в везикулярных мембранах внутри эпителиальных клеток, во многом сходным образом с тем, как инсулин мобилизует GLUT4 в мышечной и жировой ткани. Когда везикулы сливаются с плазматической мембраной эпителиальной клетки, проницаемость мембраны для воды очень сильно увеличивается, и большее количество воды реабсорбируется из собирательной трубочки и возвращается в кровь. Когда уровень АДГ падает, AQP-2 вновь поступает в везикулы, уменьшая удержание воды. При относительно редком заболевании человека несахарном диабете генетический дефект в AQP-2 приводит к нарушению ресорбции воды почками. В результате происходит выделение огромных объемов очень разбавленной мочи.

Хлоридно-бикарбонатный обменник катализирует электронейтральный котранспорт анионов через плазматическую мембрану

Эритроциты содержат другую систему облегченной диффузии — анионный обменник, необходимый для транспорта CO_2 к легким из скелетных мышц и печени. Продукт дыхания CO_2 , выделяемый из потребляющих кислород тканей в плазму крови, входит в эритроциты, где превращается в бикарбонат HCO_3^- ферментом карбонатгидразой. (Напомним, что HCO_3^- — это первичный буфер для поддержания pH крови; см. рис. 2-20.) Бикарбонат-ион HCO_3^- возвращается в плазму крови для транспорта в легкие (рис. 11-32). Поскольку растворимость HCO_3^- в плазме гораздо выше, чем у CO_2 , этот круговой путь увеличивает способность крови переносить углекислый газ из тканей в лег-

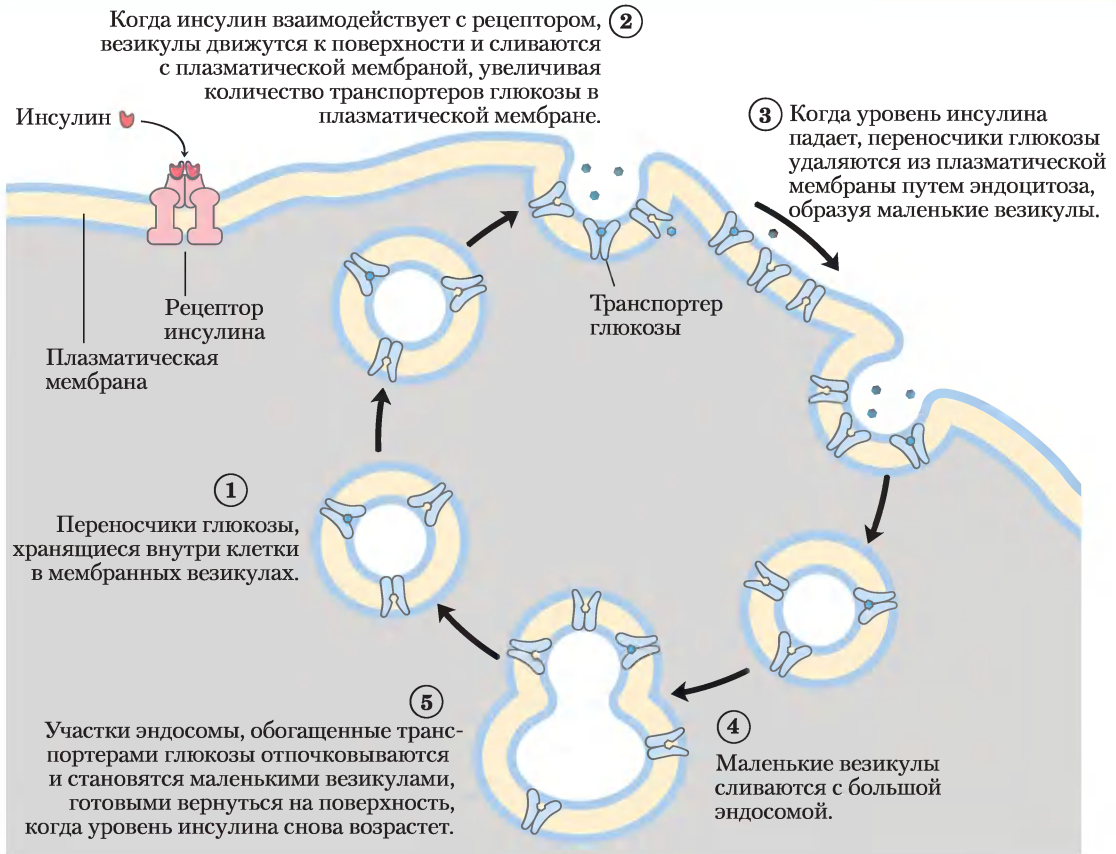
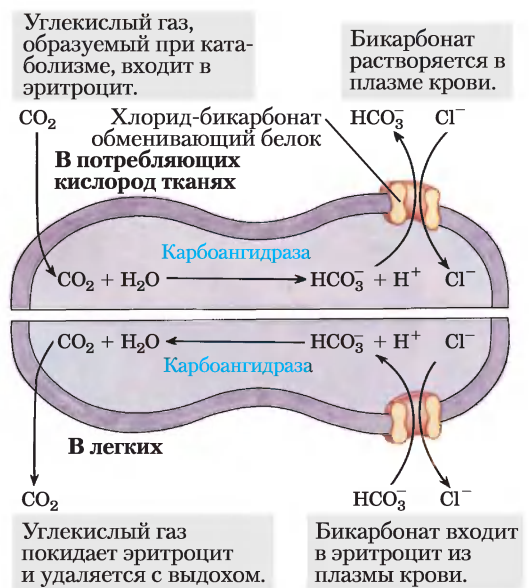


Рис. 1. Регуляция инсулином переноса глюкозы в миоцит с помощью GLUT4.

кие. В легких HCO_3^- вновь поступает в эритроциты и превращается в CO_2 , который в конце концов высвобождается в легочное пространство и уходит с выдохом. Чтобы работать эффективно, этот челночный механизм требует очень быстрого транспорта HCO_3^- через мембрану эритроцита.

Хлоридно-бикарбонатный обменник, называемый также **анионообменивающим (АЕ-) белком**, увеличивает проницаемость мембраны эритроцита для HCO_3^- более чем в миллион раз. Подобно транспортеру глюкозы, АЕ-белок представляет собой интегральный белок, который,

Рис. 11-32. Хлоридно-бикарбонатный обменник мембраны эритроцита. Эта котранспортная система делает возможными вход и выход HCO_3^- без изменений мембранного потенциала. Его роль заключается в увеличении способности крови переносить CO_2 .



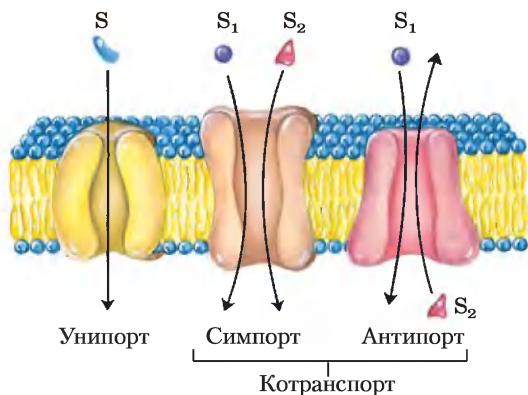


Рис. 11-33. Три главных типа транспортных систем. Транспортёры отличаются количеством переносимых веществ (субстратов) и направлением, в котором каждый из субстратов транспортируется. Примеры всех трех типов транспортеров обсуждаются в тексте. Отметим, что эта классификация ничего не говорит нам о том, являются они энергопотребляющими (активный транспорт) или энергонезависимыми (пассивный транспорт).

вероятно, пересекает мембрану по крайней мере 12 раз. Этот белок опосредует одновременное движение двух анионов: каждому иону HCO_3^- в одном направлении соответствует один ион Cl^- в противоположном направлении (**рис. 11-33**), так что в итоге нет никакого переноса заряда; обмен является **электронейтральным**. Сопряжение Cl^- и HCO_3^- обязательно; в отсутствие хлорида прекращается транспорт бикарбоната. В этом отношении анионный обменник типичен для всех систем, называемых **котранспортными системами**, которые одновременно переносят через мембрану два вещества. Когда, как в данном случае, два субстрата перемещаются в противоположных направлениях, процесс называется **антипортом**. При **симпорте** два субстрата одновременно движутся в одном направлении. Транспортёры, которые несут только один субстрат, такие как транспортер глюкозы в эритроцитах, называются системами **унипорта** (рис. 11-33).

В геноме человека обнаружены гены трех близкородственных хлоридно-бикарбонатных обменников, все они одинаково располагаются в мембране. Эритроциты содержат транспортер АЕ1, для печени характерен АЕ2, в плазматических мембранах мозга, сердца и сетчатки присутствует АЕ3. Подобные анионообменники обнаружены также у растений и микроорганизмов.

Активный транспорт приводит к перемещению веществ против градиента концентрации или электрохимического градиента

При пассивном транспорте частицы всегда движутся по электрохимическому градиенту и не накапливаются в концентрации, превышающей равновесную. Активный транспорт, напротив, приводит к накоплению веществ в концентрации выше равновесной. Активный транспорт термодинамически невыгоден (эндергоничен) и происходит только при сопряжении (прямым или непрямым) с экзергоническим процессом — поглощением солнечного света, реакцией окисления, распадом АТФ или сопутствующим потоком другого вещества по его электрохимическому градиенту. При **первичном активном транспорте** накопление вещества сопряжено непосредственно с экзергонической химической реакцией, такой как превращение АТФ в $\text{ADP} + \text{P}_i$ (**рис. 11-34**). **Вторичный активный транспорт** происходит, когда эндергонический транспорт вещества сопряжен с экзергоническим потоком другого вещества, которое первоначально было «закачено» с помощью первичного активного транспорта.

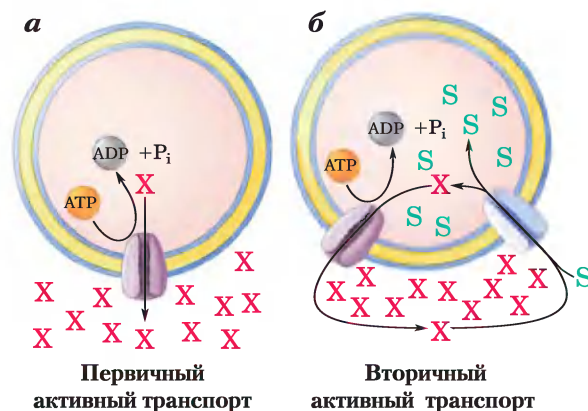


Рис. 11-34. Два типа активного транспорта. а) При первичном активном транспорте энергия, высвобождаемая при гидролизе АТФ, обеспечивает движение вещества против электрохимического градиента. б) При вторичном активном транспорте градиент иона X (часто Na^+) возникает в результате первичного активного транспорта. Движение X по электрохимическому градиенту дает энергию, чтобы осуществлять котранспорт второго вещества (S) против его электрохимического градиента.

Количество энергии, необходимое для транспорта вещества против градиента концентрации, можно рассчитать из начального градиента. В химическом процессе, который превращает S в P, происходит изменение свободной энергии:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln ([P] / [S]) \quad (11-2)$$

где $R = 8,315 \text{ Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})$ — универсальная газовая постоянная, а T — абсолютная температура. При простой диффузии вещества из области, где его концентрация C_1 , в область, где его концентрация C_2 , никаких связей не образуется и не разрывается, и изменение стандартной свободной энергии $\Delta G^\circ = 0$. Изменение свободной энергии при транспорте ΔG_t составляет

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2 / C_1) \quad (11-3)$$

Если концентрации вещества в двух компартаментах различаются в 10 раз, энергия перемещения 1 моль незаряженной частицы (вещества) при 25°C через мембрану, разделяющую компартменты, составляет

$$\begin{aligned} \Delta G &= (8,315 \text{ Дж}/\text{моль} \cdot \text{К}) \cdot 298 \text{ К} \cdot \ln (10/1) = \\ &= 5700 \text{ Дж}/\text{моль} = 5,7 \text{ кДж}/\text{моль} \end{aligned}$$

Уравнение 11-3 справедливо для всех процессов транспорта незаряженных веществ.

Пример 11-1 ЗАТРАТА ЭНЕРГИИ НА ПЕРЕКАЧИВАНИЕ НЕЗАРЯЖЕННЫХ РАСТВОРЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

Определите энергетические затраты (изменение свободной энергии) на перекачивание незаряженного растворенного вещества против $1,0 \cdot 10^4$ -кратного градиента концентрации при 25°C .

Решение. Используем уравнение 11-3. Подставим $C_2/C_1 = 1,0 \cdot 10^4$, $R = 8,315 \text{ Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})$ и $T = 298 \text{ К}$:

$$\begin{aligned} \Delta G_t &= RT \ln (C_2 / C_1) = \\ &= (8,315 \text{ Дж}/\text{моль} \cdot \text{К}) (298 \text{ К}) \ln (1,0 \cdot 10^4) = \\ &= 23 \text{ кДж}/\text{моль} \end{aligned}$$

Когда транспортируется ион, его движение без иона противоположного заряда — эндергонический процесс, приводящий к разделению положительных и отрицательных зарядов, возникает разность потенциалов; такой процесс называется

электронегенным транспортом. Энергетическая «стоимость» перемещения иона зависит от электрохимического потенциала (с. 634), суммы химического и электрического градиентов:

$$\Delta G_t = RT \ln (C_2 / C_1) + ZF \Delta \psi \quad (11-4)$$

где Z — заряд иона, $F = 96480 \text{ Дж}/\text{В} \cdot \text{моль}$ — постоянная Фарадея, $\Delta \psi$ — мембранный потенциал (в вольтах). Для плазматической мембраны клеток эукариот $\Delta \psi \approx 0,05 \text{ В}$ (внутри клетки более отрицательный, чем на внешней стороне), так что второй член уравнения 11-4 вносит существенный вклад в общее изменение свободной энергии при переносе иона. Концентрация ионов по разные стороны плазматических или внутриклеточных мембран в большинстве клеток различается в 10 раз, и поэтому для многих клеток и тканей активный транспорт является основным энергопотребляющим процессом.

Пример 11-2 ЗАТРАТА ЭНЕРГИИ НА ПЕРЕКАЧИВАНИЕ ЗАРЯЖЕННОГО РАСТВОРЕННОГО ВЕЩЕСТВА

Определите энергию (изменение свободной энергии), которая требуется при переносе ионов кальция из цитозоля, где их концентрация $\sim 1,0 \cdot 10^{-7} \text{ М}$, во внеклеточную жидкость, где их концентрация $\sim 1,0 \text{ мМ}$. Примите, что температура равна 37°C (температура тела млекопитающих), а стандартный мембранный потенциал для плазматической мембраны 50 мВ (отрицательная величина внутри клетки).

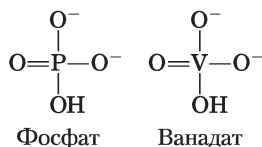
Решение. В данном расчете следует учитывать как градиент концентрации вещества, так и величину электрического потенциала. Используем уравнение 11-4. Подставим $R = 8,315 \text{ Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})$, $T = 310 \text{ К}$, $C_2 = 1,0 \cdot 10^{-3}$, $C_1 = 1,0 \cdot 10^{-7}$, $F = 96500 \text{ Дж}/(\text{В} \cdot \text{моль})$, $Z = +2$ (для Ca^{2+}) и $\Delta \psi = 0,050 \text{ В}$. Обратите внимание, что мембранный потенциал составляет 50 мВ (внутри клетки отрицательное значение), так что изменение потенциала при выходе иона из клетки наружу составляет 50 мВ .

$$\begin{aligned} \Delta G_t &= RT \ln (C_2 / C_1) + ZF \Delta \psi = \\ &= (8,315 \text{ Дж}/\text{моль} \cdot \text{К}) (310 \text{ К}) \ln \frac{1,0 \cdot 10^{-3}}{1,0 \cdot 10^{-7}} + \\ &+ 2 (96500 \text{ Дж}/\text{В} \cdot \text{моль}) (0,050 \text{ В}) = 33 \text{ кДж}/\text{моль} \end{aligned}$$

Активный транспорт имеет фундаментальное значение в биологии. Как мы увидим в гл. 19, образование АТФ в митохондриях и хлоропластах происходит по механизму АТФ-зависимого ионного транспорта, работающего в обратном направлении. Энергия, поставляемая при спонтанном потоке протонов через мембрану, может быть рассчитана из уравнения 11-4; вспомним, что ΔG для движения *по* электрохимическому градиенту — отрицательная величина, а ΔG для транспорта ионов *против* градиента — положительная.

АТФазы Р-типа подвергаются фосфорилированию в каталитическом цикле

К семейству активных транспортеров, называемых **АТФазами Р-типа**, относятся переносчики катионов, которые обратимо фосфорилируются с помощью АТФ (название «Р-тип» — от обозначения фосфата); стадия фосфорилирования — часть транспортного цикла. Фосфорилирование инициирует конформационный переход, который является ключевым в перемещении катиона через мембрану. В геноме человека закодированы по крайней мере 70 транспортных АТФаз Р-типа; они имеют сходные аминокислотные последовательности и структуру, особенно вблизи остатка Asp, который подвергается фосфорилированию. Все они представляют собой интегральные белки, состоящие из одной полипептидной цепи с восемью или десятью трансмембранными доменами (тип III на рис. 11-8), и чувствительны к ингибированию аналогом фосфата **ванадатом**.



Транспортеры Р-типа широко распространены у эукариот и бактерий. Почти во всех тканях животных работают Na^+/K^+ -АТФазы (антипортер для Na^+ и K^+) и Ca^{2+} -АТФазы (унипортер для Ca^{2+}) — АТФазы Р-типа, которые поддерживают различия в ионном составе между цитозолем и внеклеточной средой. Пристеночные клетки, выстилающие желудок млекопитающих, содержат АТФазу Р-типа, которая перекачивает через плазматическую мембрану H^+ и K^+ , обеспечивая тем самым кислотность содержимого желудка. У со-

судистых растений АТФазы Р-типа выкачивают протоны из клетки, устанавливая электрохимический градиент в 2 единицы рН и 250 мВ между сторонами плазматической мембраны. Похожая АТФаза Р-типа у хлебной плесени р. *Neurospora* выкачивает протоны из клетки для установления отрицательного потенциала на внутренней стороне мембраны, который используется для поглощения субстратов и ионов из окружающей среды посредством вторичного активного транспорта. Бактерии используют АТФазы Р-типа для выведения токсичных ионов тяжелых металлов, таких как Cd^{2+} и Cu^{2+} .

Наиболее изучена работа Ca^{2+} -насоса Р-типа, который поддерживает низкую концентрацию Ca^{2+} в цитозоле практически всех клеток. **Ca^{2+} -насос плазматической мембраны** перемещает ионы кальция из клетки, а другой насос Р-типа в эндоплазматическом ретикулуме перемещает Ca^{2+} в полость ЭР — в компартмент, отделенный от цитозоля. В миоцитах Ca^{2+} обычно находится в специализированной форме эндоплазматического ретикулума, называемого саркоплазматическим ретикулумом; высвобождение этих ионов Ca^{2+} служит сигналом мышечного сокращения.

Кальциевые насосы саркоплазматического и эндоплазматического ретикулумов (SERCA) — АТФазы Р-типа, очень близкие по структуре и механизму. Насос SERCA саркоплазматического ретикулума, на который приходится 80% белка в этой мембране, состоит из одного полипептида ($M_r \sim 100\,000$), который пронизывает мембрану 10 раз (рис. 11-35). Три цитоплазматических домена в виде длинных петель соединяют трансмембранные спирали: N-домен, где связываются нуклеотид АТФ и Mg^{2+} ; Р-домен, который содержит фосфорилированный остаток Asp, присущий всем АТФазам Р-типа; и А-домен (от англ. *actuator* — пусковой механизм), обеспечивающий контакт N- и Р-доменов с двумя Ca^{2+} -связывающими сайтами. М-домен содержит трансмембранные спирали и Ca^{2+} -связывающие сайты, которые локализованы вблизи середины мембранного бислоя на расстоянии 40–50 Å от фосфорилированного остатка Asp, так что фосфорилирование–дефосфорилирование Asp не напрямую влияет на связывание ионов кальция.

Предположительный механизм работы насосов SERCA (рис. 11-36) включает большие кон-

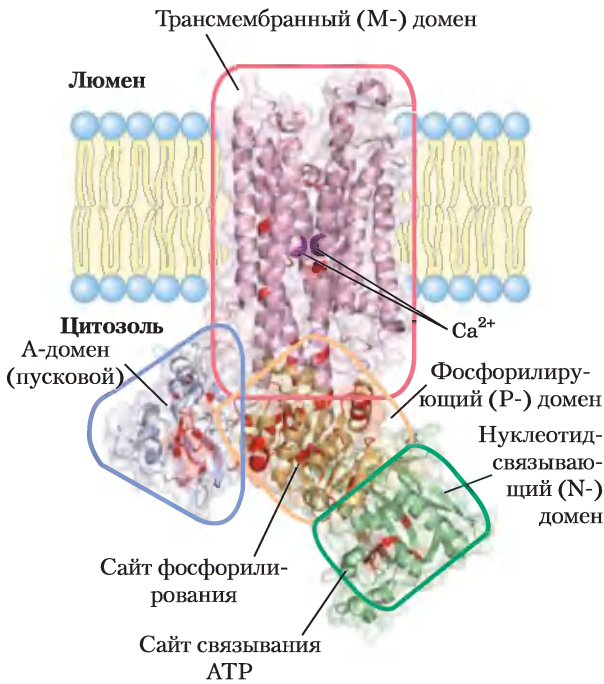


Рис. 11-35. Ca^{2+} -насос саркоплазматического ретикулума: SERCA. (PDB ID 1EUL) Десять трансмембранных спиралей окружают канал, по которому Ca^{2+} движется через мембрану. Две из этих спиралей прерываются вблизи середины бислоя, а их неспиральные области образуют связывающие сайты для двух ионов Ca^{2+} (пурпурные). Карбоксилатные группы остатка Asp в одной спирали и остаток Glu в другой — главные в Ca^{2+} -связывающих сайтах. Три глобулярных домена располагаются со стороны цитоплазмы: N-домен (нуклеотид-связывающий; очерчен зеленым) имеет связывающий сайт для ATP; P-домен (фосфорилирующий) содержит остаток Asp^{351} (в оранжевом кружочке), который подвергается обратимому фосфорилированию, A-домен (от англ. *actuator* — пусковой механизм; голубой треугольник) опосредует структурные переходы, изменяющие сродство Ca^{2+} -связывающего сайта к Ca^{2+} и его расположение в цитоплазме или в полости ретикулума. Отметим, что между фосфорилирующим и Ca^{2+} -связывающими сайтами большое расстояние. Такая структура насоса SERCA является прототипом всех АТФаз Р-типа; в ней обнаружены некоторые основания (выделены красным цветом), консервативные для всех членов семейства АТФаз Р-типа.

формационные перестройки и фосфорилирование–дефосфорилирование ключевого остатка Asp в P-домене в течение каталитического цикла. В каждом каталитическом цикле два иона кальция проходят через мембрану, а ATP превращается в ADP и P_i . Роль связывания и гидролиза ATP — в осуществлении перегруппировки между

двумя конформациями транспортера (E1 и E2). В конформации E1 два Ca^{2+} -связывающих сайта находятся со стороны цитозоля в эндоплазматическом или саркоплазматическом ретикулуме и очень эффективно присоединяют ионы Ca^{2+} .

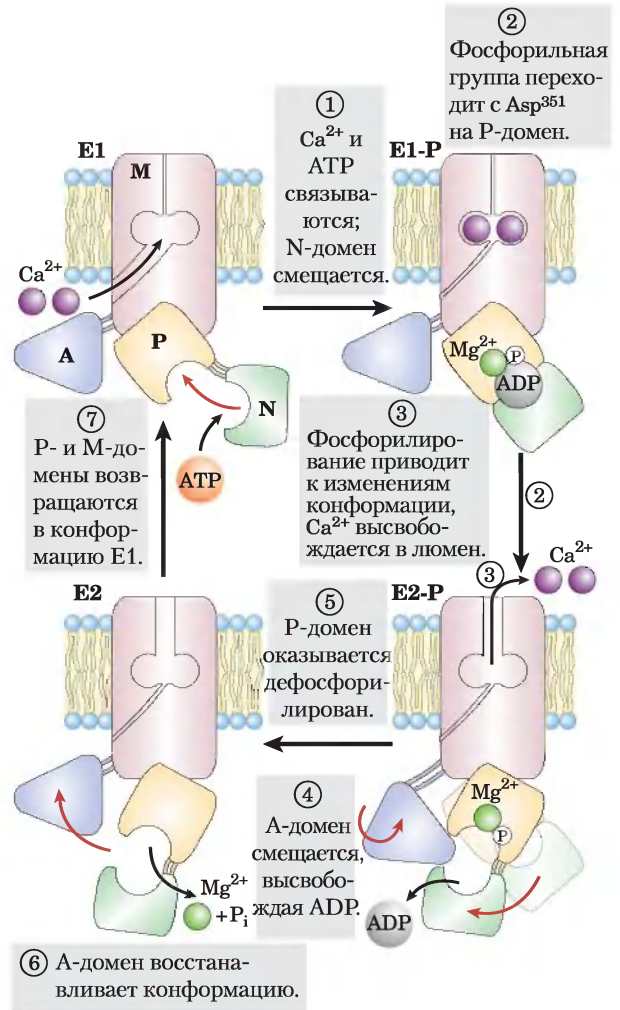


Рис. 11-36. Механизм действия насоса SERCA. В начале транспортного цикла белок существует в конформации E1 и участки связывания ионов кальция находятся на стороне цитозоля. На них происходит связывание двух Ca^{2+} , а затем молекула ATP связывается с переносчиком и фосфорилирует остаток Asp^{351} , в результате чего образуется E1-P. Фосфорилирование способствует переходу в другую конформацию — E2-P, в которой участки связывания ионов кальция (теперь обладающие низким сродством к ионам Ca^{2+}) оказываются на другой стороне мембраны (обращены в сторону внеклеточного пространства), что позволяет ионам кальция высвободиться и уйти. Наконец, E2-P подвергается дефосфорилированию, что приводит к возвращению белка в исходное состояние E1 и к началу нового цикла.

Связывание АТФ и фосфорилирование Asp вызывают смену конформации с E_I на E₂, в которой Ca²⁺-связывающие сайты обращены уже на внутреннюю (люменальную) сторону мембраны, а их аффинность к Ca²⁺ значительно снижается, и Ca²⁺ высвобождается в просвет полости ретикулума. По этому механизму энергия гидролиза АТФ за один цикл фосфорилирования–дефосфорилирования идет на перенос Ca²⁺ через мембрану против высокого электрохимического градиента.

Вариации основного механизма мы находим в работе **Na⁺/K⁺-АТФазы** плазматической мембраны, открытой Йенсом Скоу в 1957 г. Этот котранспортер сопрягает фосфорилирование–дефосфорилирование ключевого остатка Asp с одновременным движением Na⁺ и K⁺ против их электрохимических градиентов (рис. 11-37). Именно Na⁺/K⁺-АТФаза отвечает за поддержание низкой

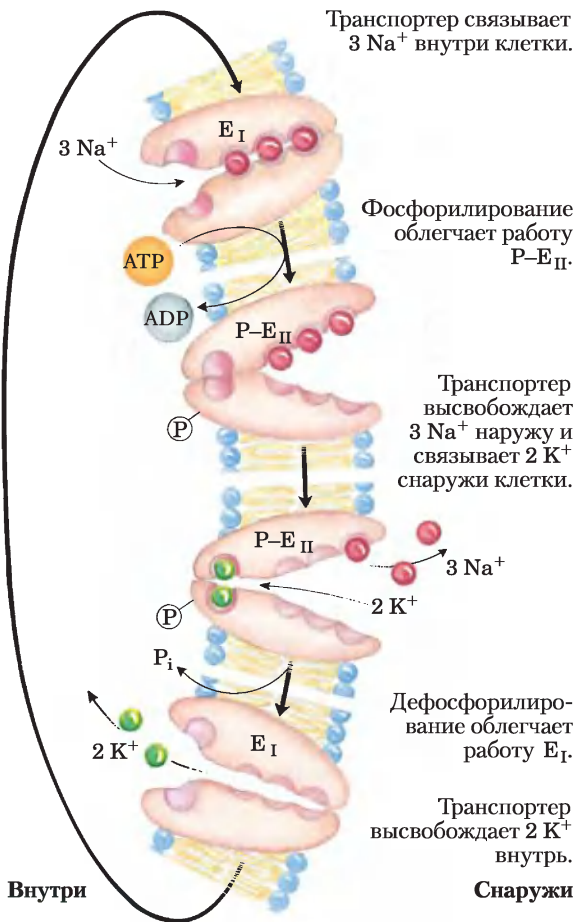


Рис. 11-37. Предположительный механизм транспорта Na⁺/K⁺-АТФазой ионов Na⁺ и K⁺.

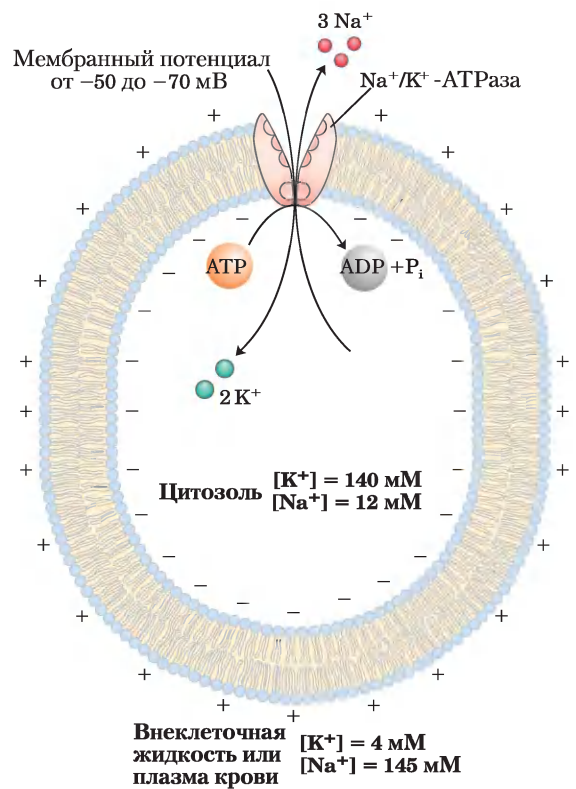


Рис. 11-38. Роль Na⁺/K⁺-АТФазы в клетках животных. В клетках животных эта система активного транспорта отвечает прежде всего за установление и поддержание внутриклеточной концентрации Na⁺ и K⁺ и за генерацию трансмембранного электрического потенциала. Это достигается переносом трех ионов Na⁺ из клетки на каждые два K⁺, поступающих внутрь. Электрический потенциал играет главную роль в электрической сигнализации в нейронах, а градиент Na⁺ обеспечивает котранспорт против градиента веществ в многих типах клеток.

концентрации Na⁺ и высокой концентрации K⁺ в клетке по сравнению с межклеточной жидкостью (рис. 11-38). На каждую молекулу АТФ, превращенного в ADP и P_i, приходится два иона K⁺, перемещенных внутрь, и три иона Na⁺, перемещенных наружу через плазматическую мембрану. Следовательно, котранспорт представляет собой электрогенный процесс, приводящий к разделению зарядов на мембране; в клетках животных создается мембранный потенциал от -50 до -70 мВ (более отрицательное значение внутри клетки по сравнению с наружной стороной). Эти процессы происходят во многих клетках, а для проведения потенциалов действия в нейронах они имеют решающее



Йенс Скоу

значение. Важность Na^+/K^+ -АТФазы можно понять по количеству энергии, расходуемой человеком на ее работу — около 50% всей энергии, затрачиваемой в состоянии покоя!

АТФазы F-типа — это обратимые АТФ-зависимые протонные насосы

АТФазные активные транспортеры **F-типа** катализируют трансмембранный перенос протонов

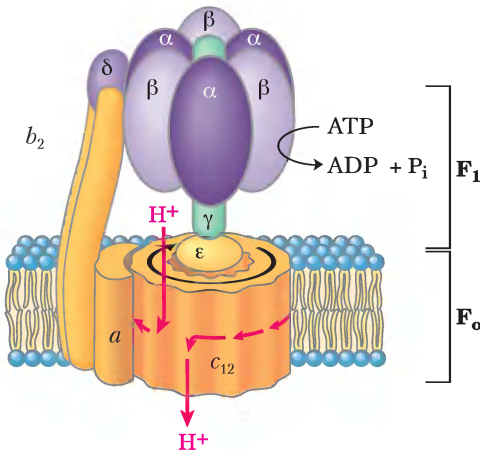


Рис. 11-39. Строение F_0F_1 -АТФазы/АТФ-синтазы. АТФазы F-типа содержат периферический домен F_1 , состоящий из трех α -субъединиц, трех β -субъединиц, одной δ -субъединицы (фиолетовый цвет) и центрального стержня (γ -субъединица, зеленый цвет). Интегральная часть АТФаз F-типа F_0 (оранжевый) имеет множественные копии c -субъединицы, одну a - и две b -субъединицы. F_0 образует трансмембранный канал, через который перекачивается в среднем четыре протона (красные стрелки) на каждую молекулу АТФ, гидролизованную на β -субъединицах F_1 . Удивительный механизм, посредством которого эти два события сопрягаются, детально описан в гл. 19. Он включает вращение F_0 относительно F_1 (черная стрелка). Строение V_0V_1 и A_0A_1 практически такое же, как у F_0F_1 . Похож, вероятно, и механизм их действия.

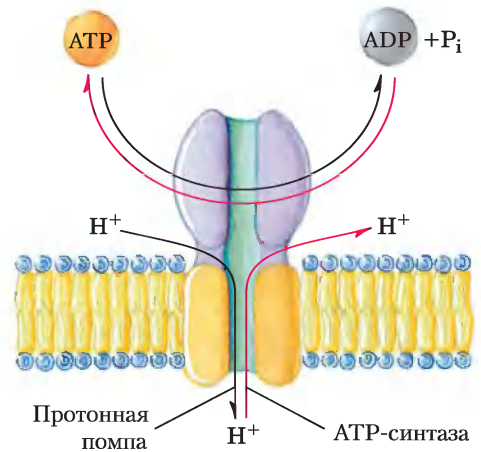


Рис. 11-40. Обратимость АТФаз F-типа. АТФ-зависимый протонный транспортер может также катализировать синтез АТФ (красные стрелки), когда протоны движутся по электрохимическому градиенту. Это центральная реакция в процессах окислительного фосфорилирования и фотофосфорилирования (оба подробно описаны в гл. 19).

против градиента, приводимый в действие гидролизом АТФ. Название «F-тип» происходит из определения этих АТФаз как энергосопрягающих факторов (англ. *factors*). Интегральный мембранный белковый комплекс F_0 (рис. 11-39; нижний индекс «0» — от названия его ингибитора олигомицина) образует трансмембранную пору для протонов, а периферический белок F_1 (индекс 1 показывает, что он был первым из нескольких факторов, выделенных из митохондрий) является молекулярной машиной, которая использует энергию АТФ для перемещения протонов против градиента (в область с более высокой концентрацией H^+). Система F_0F_1 перекачивающих протоны транспортеров появилась, по-видимому, на очень раннем этапе эволюции. Бактерии, такие как *E. coli*, используют АТФазный комплекс F_0F_1 в плазматической мембране для того, чтобы выкачивать протоны наружу, а археи имеют гомологичный протонный насос — АТФазу A_0A_1 .

Реакция, катализируемая АТФазами F-типа, обратима; протонный градиент может обеспечивать энергией для запуска обратной реакции — синтеза АТФ (рис. 11-40). АТФазы F-типа, работающие в этом направлении, более принято называть **АТФ-синтазами**. АТФ-синтазы играют главную роль при образовании АТФ в митохондриях в процессе окислительного фосфорили-

рования и в хлоропластах при фотофосфорилировании, а также у зубактерий и архей. Градиент протонов, нужный для запуска синтеза АТФ, образуется в результате деятельности других протонных насосов, которые снабжаются энергией окисления субстрата или солнечного света. Мы вернемся к детальному описанию этих процессов в гл. 19.

АТФ-азы V-типа (V от англ. *vacuolar* — вакуолярный), составляющие класс протон-транспортирующих АТФаз, структурно (и, возможно, по механизму действия) сходные с АТФазами F-типа, ответственны за закисление внутриклеточных компартментов во многих организмах. Протонные насосы этого типа поддерживают в вакуолях грибов и высших растений рН между 3 и 6, т. е. гораздо ниже, чем рН окружающего цитозоля (рН 7,5). АТФазы V-типа обеспечивают также закисление лизосом, эндосом, комплекса Гольджи и секреторных везикул в животных клетках. Все АТФ-азы V-типа имеют сходную структуру комплекса: интегральный (трансмембранный) домен V_o , который служит протонным каналом, и периферический домен V_i , который содержит АТФ-связывающий сайт и обладает АТФазной активностью. Механизм сопряжения переноса протонов АТФазами V-типа против градиента с гидролизом АТФ детально не изучен.

АВС-переносчики используют АТФ для запуска активного транспорта множества субстратов

АВС-переносчики (рис. 11-41) образуют большое семейство АТФ-зависимых переносчиков, выкачивающих аминокислоты, пептиды, белки, ионы металлов, различные липиды, желчные соли и многие гидрофобные соединения, в том числе лекарства, из клетки против градиента концентрации. Один из АВС-переносчиков у человека — **белок множественной лекарственной устойчивости 1** — (MDR1) отвечает за паразитную устойчивость определенных опухолей к действию противоопухолевых препаратов, в других случаях эффективных. MDR1 обладает широкой субстратной специфичностью к гидрофобным соединениям, включая, например, химиотерапевтические средства адриамицин, доксорубицин и винбластин. Выкачивая эти лекарства из клетки, транс-

портер препятствует их накоплению в опухоли и таким образом блокирует терапевтический эффект применяемой химиотерапии. MDR1 — интегральный мембранный белок ($M_r \approx 170\,000$) с 12 трансмембранными доменами и двумя АТФ-связывающими доменами («кассетами»), которые и дают название данному семейству: АТФ-связывающие кассетные переносчики (от англ. *ATP-binding cassettes transporters*). ■

Все АВС-переносчики содержат два нуклеотидсвязывающих домена (NBD) и два трансмембранных домена (рис. 11-41). В некоторых случаях все эти домены представляют собой один длинный полипептид; другие АВС-переносчики состоят из двух субъединиц, причем каждая содержит NBD и домен с шестью (или иногда 10) трансмембранными спиралями. Многие из АВС-переносчиков находятся в плазматической мембране, но некоторые обнаружены также в эндоплазматическом ретикулуме и в мембранах митохондрий и лизосом. Большинство АВС-переносчиков работают как насосы, но по крайней мере некоторые члены этого суперсемейства функционируют как ионные каналы, которые открываются и закрываются при гидролизе АТФ. CFTR-переносчик (доп. 11-3) является Cl^- -каналом, который приводится в действие гидролизом АТФ.

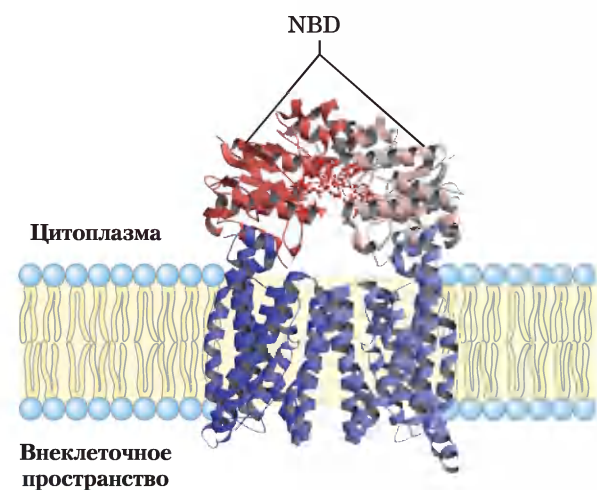


Рис. 11-41. АВС-переносчик *E. coli*. Импортер витамина B_{12} BtuCD (PDP ID 1L7V) — гомодимер с 10 спиральными трансмембранными доменами (голубой цвет). Два нуклеотидсвязывающих домена (NBD; красные) экспонированы в цитоплазму. Остатки, участвующие в связывании и гидролизе АТФ, показаны в виде шаростержневых моделей.



Кистозный фиброз (КФ) — серьезное и довольно распространенное наследственное заболевание человека. Около 5% белых американцев являются его носителями, они имеют одну дефектную и одну нормальную копии соответствующего гена. Только у людей с двумя дефектными копиями проявляются выраженные симптомы болезни: закупорка желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей, обычно приводящая к бактериальной инфекции и смерти в возрасте до 30 лет из-за дыхательной недостаточности. При КФ тонкий слой слизи, который в норме покрывает внутреннюю поверхность легких, патологически утолщается, преграждает путь потоку воздуха и дает приют патогенным бактериям, особенно *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Дефектный ген у пациентов с КФ был открыт в 1989 г. Он кодирует мембранный белок, называемый мембранным регулятором проводимости (CFTR, от англ. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). В этом белке два домена, каждый содержит шесть трансмембранных спиралей, два нуклеотидсвязывающих домена (NBD) и регуляторный участок (рис. 1). Таким образом, CFTR очень близок по строению к ABC-переносчикам. В норме CFTR работает как канал, специфичный к ионам Cl^- . Канал проводит ионы хлора через плазматическую мембрану, когда оба домена NBD связаны с АТФ, а когда АТФ на одном из NBD разлагается на ADP и P_i , он

Продолжение на следующей странице

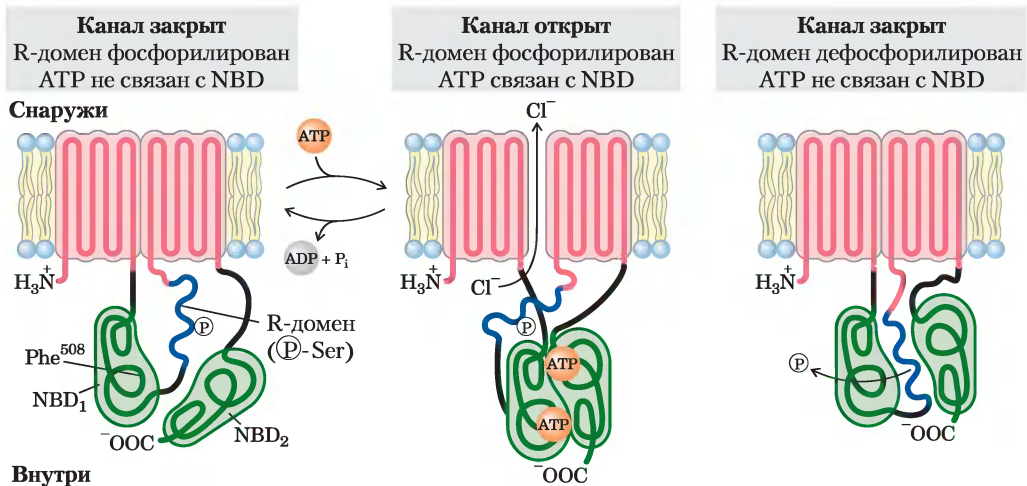


Рис. 1. Три состояния мембранного регулятора проводимости CFTR. Белок состоит из двух доменов, в каждом из которых по шесть трансмембранных спиралей; кроме того, на цитоплазматической поверхности мембраны находятся три функционально значимых домена: нуклеотидсвязывающие NBD₁ и NBD₂ (зеленые) и присоединяющие АТФ, а регуляторный домен (синий) — участок фосфорилирования под действием сАМР-зависимой протеинкиназы. Когда этот R-домен фосфорилирован, но в доменах NBD не произошло связывания АТФ (слева), канал закрыт. Связывание АТФ открывает канал (в центре), который находится в таком состоянии, пока не произойдет гидролиз АТФ. Если регуляторный домен дефосфорилирован (справа), он связывается с доменами NBD и предотвращает связывание АТФ и открытие канала. Наиболее распространенной мутацией, приводящей к развитию кистозного фиброза, является делеция остатка Phe⁵⁰⁸ в домене NBD₁ (слева). CFTR — типичный ABC-переносчик, за исключением двух особенностей: во-первых, в большинстве ABC-переносчиков отсутствует регуляторный домен, во-вторых, CFTR выступает в роли ионного канала (для ионов Cl^-), что нетипично для переносчика.



закрывается. Хлорный канал регулируется фосфорилированием нескольких остатков Ser в регуляторном домене и катализируется cAMP-зависимой протеинкиназой (гл. 12). Когда регуляторный домен не фосфорилирован, Cl⁻-канал закрыт. Мутация CFTR, приводящая к развитию КФ, в 70% случаев — это делеция остатка Phe в положении 508. Результатом является неправильная укладка мутантного белка и, следовательно, при включении его в плазматическую мембрану, — уменьшение проведения Cl⁻ через мембраны клеток эпителия, выстилающего дыхательные пути (рис. 2), пищеварительный тракт и железы внешней секреции (поджелудочная железа, потовые железы, желчные протоки и семявыносящие протоки).

Ослаблению экспорта Cl⁻ сопутствует уменьшение выделения воды из клеток, приводящее к тому, что слизь на их поверхности высыхает, утолщается и становится чрезмерно липкой. В норме реснички на эпителиальных клетках, которые выстилают внутреннюю поверхность легких, непрерывно выбрасывают прочь бактерий, которые оседают на слизи, но



Рис. 2. Слизь, выстилающая легкие, улавливает бактерии. В здоровых легких эти бактерии уничтожаются и выбрасываются с помощью ресничек. При КФ бактерицидная активность нарушается, что приводит к повторным инфекциям и прогрессирующему поражению легких.

утолщенная слизь у больного КФ препятствует этому процессу. Постоянное действие таких бактерий, как *S. aureus* и *P. aeruginosa*, все сильней и сильней повреждает легкие и уменьшает эффективность дыхания. Распространенной причиной смерти людей, страдающих КФ, являются респираторные заболевания.



Нуклеотидсвязывающие домены всех АВС-белков имеют похожие аминокислотные последовательности и, по-видимому, сходную трехмерную структуру; это консервативная молекулярная машина, которая может сопрягаться с множеством насосов и каналов. При сопряжении с насосом АТР-зависимая машина перемещает вещества против градиента концентрации; при сопряжении с ионным каналом она открывает и закрывает канал, используя АТР как источник энергии. Стехиометрия АВС-насосов такова: примерно одна молекула АТР гидролизуется при переносе одной молекулы субстрата, но ни механизм сопряжения, ни участок связывания субстрата неизвестны.

Некоторые АВС-переносчики обладают очень высокой специфичностью к одному субстрату; другие менее «разборчивы». Геном человека содержит по крайней мере 48 генов, кодирующих АВС-белки, многие из них участвуют в поддержании состава и состояния липидного бислоя, а также в транспорте стероидов, их производных и жирных кислот в орга-

низме. К АВС-переносчикам относятся также флиппазы, которые переносят мембранные липиды в бислой с одного монослоя на другой; АВС-переносчик в своем составе содержит и клеточный аппарат для экспорта избытка холестерина. Мутации в генах, которые кодируют некоторые из этих процессов, обуславливают генетические заболевания, в том числе кистозный фиброз (доп. 11-3), танжерскую болезнь (доп. 21-3), дегенерацию сетчатки, анемию и печеночную недостаточность.

АВС-переносчики есть и у более простых животных, и у растений, и у микроорганизмов. Дрожжи несут 31 ген, кодирующий АВС-переносчики, у мушки р. *Drosophila* их 56, у бактерии *E. coli* — 80 (2% всего генома). АВС-переносчики могут придавать патогенным микробам устойчивость к антибиотикам (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Plasmodium falciparum*), что имеет самое серьезное отношение к проблемам здоровья человека, и при создании лекарств эти белки выбирают как привлекательную мишень. ■

Организм/ткань/тип клеток	Переносимое вещество (движется против градиента)	Котранспортируемое вещество (движется по градиенту)	Тип транспорта
<i>E. coli</i>	Лактоза	H ⁺	Симпорт
	Пролин	H ⁺	Симпорт
	Дикарбоновые кислоты	H ⁺	Симпорт
Кишечник, почки (позвоночных)	Глюкоза	Na ⁺	Симпорт
	Аминокислоты	Na ⁺	Симпорт
Клетки позвоночных (многих типов)	Ca ²⁺	Na ⁺	Антипорт
Высшие растения	K ⁺	H ⁺	Антипорт
Грибы (р. <i>Neurospora</i>)	K ⁺	H ⁺	Антипорт

Ионные градиенты снабжают энергией вторичный активный транспорт

Ионные градиенты, возникающие при первичном транспорте Na⁺ или H⁺, могут в свою очередь обеспечивать движущую силу для котранспорта других веществ. Многие типы клеток содержат транспортные системы, которые сопрягают спонтанный поток ионов по градиенту с одновременным закачиванием против градиента другого иона, сахара или аминокислоты (табл. 11-4).

Переносчик лактозы (лактозопермеаза)
E. coli — хорошо изученный прототип переносящих протоны транспортеров. Этот белок состоит из одной полипептидной цепи (417 остатков) и функционирует в виде мономера, осуществляя перенос одного протона и одной молекулы лактозы в клетку и обеспечивая накопление лактозы (рис. 11-42). У *E. coli* градиент протонов и заряда на плазматической мембране образуется, как правило, при окислении пищи, энергия

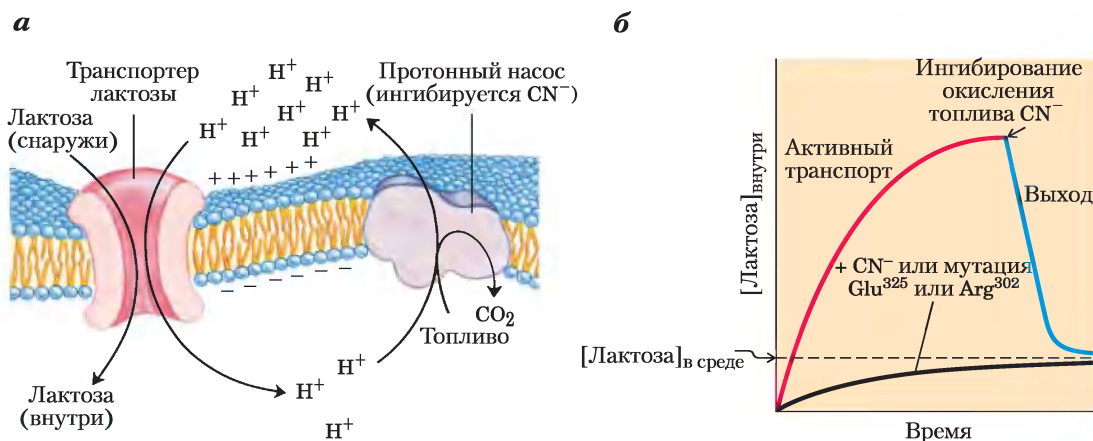


Рис. 11-42. Поглощение лактозы у *E. coli*. а) Первичный транспорт H⁺ из клетки, приводимый в действие посредством окисления разных топливных молекул, создает и протонный градиент, и электрический потенциал на мембране (отрицательный внутри). Вторичный активный транспорт лактозы в клетку включает симпорт H⁺ и лактозы транспортером. Поглощение лактозы против градиента концентрации полностью зависит от этого потока H⁺ внутрь, движимого электрохимическим градиентом. б) Когда поставляющие энергию окислительные реакции метаболизма блокируются цианид-ионом (CN⁻), транспортер лактозы уравнивает концентрацию лактозы внутри и вне клетки путем пассивного транспорта. Мутации, которые влияют на Glu³²⁵ или Arg³⁰², оказывают такое же действие, как цианид-ион. Пунктирная линия показывает концентрацию лактозы в окружающей среде.

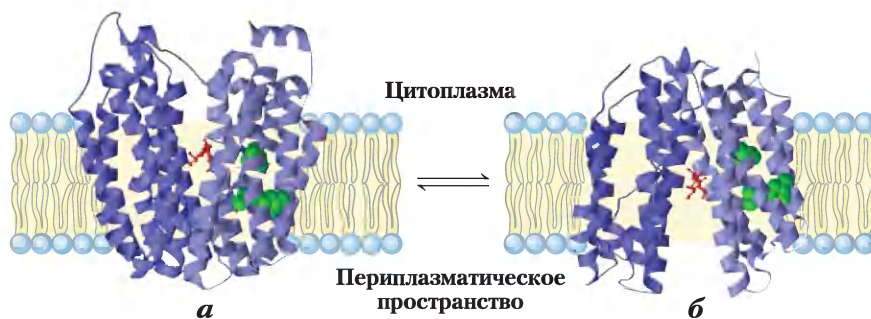


Рис. 11-43. Транспортёр лактозы (лактопермеаза) *E. coli*. *а*) Показана ленточная модель пермеазы в мембране. 12 трансмембранных спиралей образуют два почти симметричных домена (сиреневый и фиолетовый). Для этой формы белка была определена кристаллическая структура (источник PDB ID 1PV7). Субстрат (молекула лактозы, показана красным) связан с переносчиком по центру мембраны со стороны цитоплазмы. *б*) Предположительное строение транспортера после значительного обратимого изменения конформации. Субстратсвязывающий сайт обращен наружу, в сторону периплазматического пространства (*справа*), происходит захват молекулы лактозы, а затем конформация меняется снова, высвобождая лактозу в цитоплазму (*слева*). Взаимопревращение этих двух форм происходит при изменении спаривания заряженных (протонированных) остатков в боковых цепях, например, Glu³²⁵ и Arg³⁰² (показаны зеленым), которое определяется трансмембранным протонным градиентом.

окисления используется для выкачивания протонов наружу. (Этот механизм подробно обсуждается в гл. 19.) Липидный бислой непроницаем для протонов, но переносчик лактозы обеспечивает дорогу для возвращения протона, а лактоза одновременно переносится внутрь клетки (симпорт). Эндергоническое накопление лактозы сопряжено, таким образом, с экзергоническим входом протонов в клетку, и для суммарного процесса $\Delta G < 0$.

Транспортер лактозы — один из представителей главных суперсемейства **облегчающих транспорт факторов (MFS** — от англ. *major facilitator superfamily*), которое охватывает 28 семейств. Почти все белки этого суперсемейства содержат по 12 трансмембранных доменов (у нескольких белков — 14). Белки обладают сравнительно небольшой гомологией последовательностей, но сходство их вторичной структуры и топологии свидетельствует об одинаковой третичной структуре. Кристаллографический анализ транспортера лактозы *E. coli* был проведен Роном Кэбаком и Соу Иватой в 2003 г. (рис. 11-43, *а*). Этот белок содержит 12 трансмембранных спиралей и связывающие петли, которые «высовываются» в цитоплазму или периплазматическое простран-

ство. Все шесть N-концевых и шесть C-концевых спиралей образуют очень похожие домены, давая структуру с нестрогой двойной симметрией. В кристаллической форме белка видна большая заполненная водой полость, открытая в цитоплазму клетки. Субстратсвязывающий сайт находится в этой полости примерно по центру мембраны. Со стороны периплазматического пространства транспортер закрыт, так что лактоза не может войти в клетку. Предложен механизм трансмембранного переноса субстрата (рис. 11-43, *б*), при котором домены колеблются относительно друг друга, происходит связыванием субстрата и перенос протона, при этом субстратсвязывающий сайт попеременно экспонируется в цитоплазму и периплазму. Эта модель, называемая моделью качающегося банана, сходна с моделью для GLUT1 (рис. 11-31).

Как движение протона в клетку сопряжено с поглощением лактозы? В результате обширных генетических исследований транспортера лактозы установлено, что из 417 аминокислотных остатков в белке только шести совершенно необходимы для котранспорта H^+ и лактозы — одни для связывания лактозы, другие для транспорта протонов. Мутация в одном из двух

остатков (Glu³²⁵ и Arg³⁰²; рис. 11-43) приводит к тому, что белок еще способен катализировать облегченную диффузию лактозы, но не способен сопрягать поток H⁺ с переносом лактозы против ее градиента. Сходный эффект наблюдается для клеток дикого типа (без мутаций), когда их способность генерировать протонный градиент блокируется CN⁻-ионами: переносчик выполняет облегченную диффузию нормально, но не может перекачивать лактозу против градиента концентрации (рис. 11-42, б). На баланс между двумя конформациями транспортера лактозы влияют изменения зарядов в боковых цепях связанных остатков аминокислот.

В эпителиальных клетках кишечника глюкоза и некоторые аминокислоты накапливаются посредством симпорта с движением Na⁺ по градиенту, созданному Na⁺/K⁺-АТФазой плазматической мембраны (рис. 11-44). Апикальная поверхность клетки кишечного эпителия покрыта микровор-

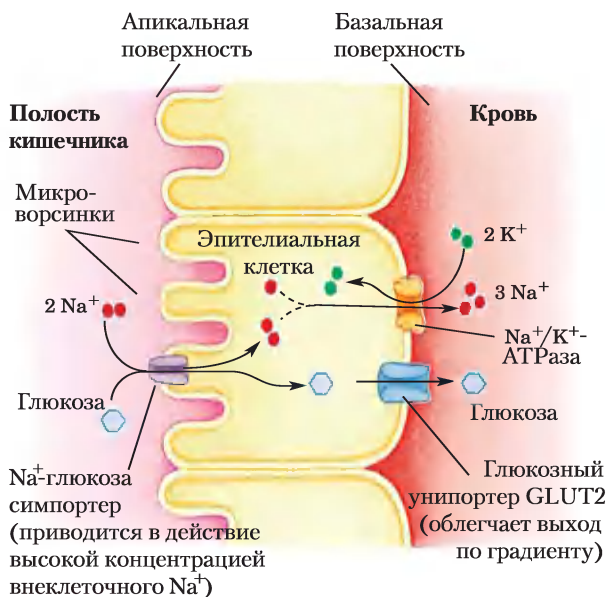
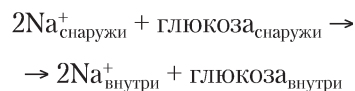


Рис. 11-44. Транспорт глюкозы в клетках кишечного эпителия. Молекула глюкозы котранспортируется с Na⁺ через апикальную плазматическую мембрану в эпителиальную клетку. Она движется через клетку к базальной поверхности, где переходит в кровь с помощью GLUT2 — пассивного переносчика глюкозы. Na⁺/K⁺-АТФаза продолжает выкачивать Na⁺ наружу для поддержания градиента Na⁺, который обеспечивает поглощение глюкозы. Na⁺-глюкозные симпортеры в апикальной плазматической мембране захватывают глюкозу из кишечника за счет энергии «нисходящего» потока Na⁺ по градиенту.

синками — длинными тонкими выростами плазматической мембраны, которые многократно увеличивают площадь поверхности, экспонированной внутрь кишечника.



Энергия, необходимая для этого процесса, получается из двух источников: более высокая концентрация Na⁺ снаружи, чем внутри (химический потенциал), и трансмембранный потенциал, который отрицателен на внутренней стороне мембраны, и поэтому Na⁺ поступает внутрь клетки.

Пример 11-3 ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ЗАТРАТЫ ПРИ СИМПОРТЕ

Рассчитайте максимальное отношение

$$\frac{[\text{глюкоза}]_{\text{внутри}}}{[\text{глюкоза}]_{\text{снаружи}}}$$

которое может достигаться с помощью Na⁺-глюкозных симпортеров в плазматической мембране эпителиальной клетки, если [Na⁺]_{внутри} = 12 мМ, [Na⁺]_{снаружи} = 145 мМ, мембранный потенциал –50 мВ (отрицательное значение внутри клетки), температура 37 °С.

Решение. Используя уравнение 11-4 (с. 559), можно рассчитать энергию электрохимического градиента ионов Na⁺, т. е. определить энергетические затраты на перемещение одного иона Na⁺ против этого градиента:

$$\Delta G_{\text{т}} = RT \ln \frac{[\text{Na}]_{\text{снаружи}}}{[\text{Na}]_{\text{внутри}}} + ZF \Delta \psi$$

Подставим численные значения R , T и F , заданное значение для [Na⁺] (в молях), $Z = +1$ (поскольку ион Na⁺ имеет один положительный заряд) и $\Delta \psi = 0,050$ В. По условию мембранный потенциал –50 мВ (отрицательное значение внутри клетки), так что изменение потенциала при переносе иона из клетки наружу составляет 50 мВ.

$$\Delta G_{\text{т}} = (8,315 \text{ Дж/моль} \cdot \text{К}) (310 \text{ К}) \ln \frac{1,45 \cdot 10^{-1}}{1,2 \cdot 10^{-2}} + \\ + 1 (96500 \text{ Дж/В} \cdot \text{моль}) (0,050 \text{ В}) = \\ = 11,2 \text{ кДж/моль}$$

Это значение ΔG_t представляет собой изменение свободной энергии при переносе 1 моль ионов Na^+ , и эта энергия может использоваться для переноса глюкозы. Учитывая, что при переносе одной молекулы глюкозы при симпорте происходит перенос двух ионов Na^+ по электрохимическому градиенту в клетку, получаем, что при переносе 1 моль глюкозы запасается энергия $2 \cdot 11,2 \text{ кДж/моль} = 22,4 \text{ кДж/моль}$. Теперь можно найти концентрацию глюкозы, которую можно получить с помощью такого насоса. Используем уравнение 11-3 (с. 559):


$$\Delta G_t = RT \ln \frac{[\text{ГЛЮКОЗА}]_{\text{внутри}}}{[\text{ГЛЮКОЗА}]_{\text{снаружи}}}$$

Подставляем численные значения ΔG_t , R и T :

$$\begin{aligned} \ln \frac{[\text{ГЛЮКОЗА}]_{\text{внутри}}}{[\text{ГЛЮКОЗА}]_{\text{снаружи}}} &= \frac{\Delta G}{RT} = \\ &= \frac{22,4 \text{ кДж/моль}}{(8,315 \text{ Дж/моль} \cdot \text{К}) (310 \text{ К})} = 8,69 \\ \frac{[\text{ГЛЮКОЗА}]_{\text{внутри}}}{[\text{ГЛЮКОЗА}]_{\text{снаружи}}} &= e^{8,69} = 5,94 \cdot 10^3 \end{aligned}$$

Таким образом, с помощью котранспортного механизма глюкоза может проникать в эпителиальную клетку до тех пор, пока ее внутриклеточная концентрация не превысит ее внеклеточную концентрацию (в кишечнике) почти в 6000 раз.

По мере того как глюкоза переносится из кишечника в эпителиальные клетки на апикальной стороне, она одновременно поступает из клетки в кровь посредством пассивного транспорта с помощью глюкозного транспортера GLUT2 на базальной стороне (рис. 11-44). Решающая роль Na^+ в подобных системах симпорта и антипорта требует непрерывного выкачивания Na^+ из клетки для поддержания трансмембранного градиента Na^+ .

 Ввиду важности ионных градиентов для активного транспорта и сохранения энергии, соединения, разрушающие ионные градиенты на клеточных мембранах, оказываются эффективными ядами, причем те из них, которые специфичны для болезнетворных микроорганизмов, можно применять как антибиотики. Так, валиномицин, циклический пептид с гидрофобными свойствами, нейтрализует заряд K^+ , окружая этот

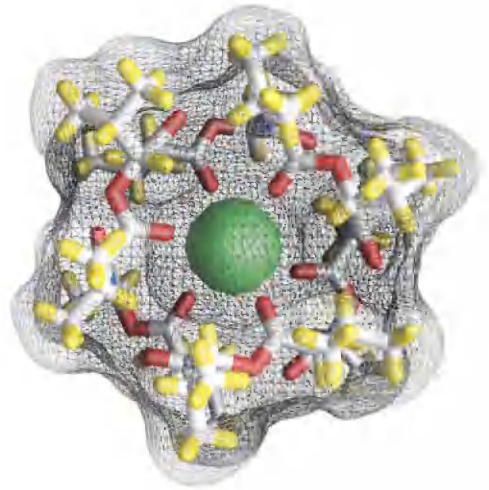


Рис. 11-45. Валиномицин — K^+ -связывающий пептидный ионофор. Контуры поверхности показаны как прозрачная сетка, через которую видны пептид (структура из палочек) и ион K^+ (зеленый). Атомы кислорода (красный цвет) в центральной гидрофильной полости связывают K^+ . Гидрофобные боковые цепи аминокислот (желтый цвет) покрывают внешнюю сторону молекулы. Поскольку наружная сторона K^+ -валиномицинового комплекса гидрофобна, этот комплекс легко диффундирует через мембрану, перенося K^+ по градиенту концентрации. Происходящая в результате потеря трансмембранного ионного градиента убивает микробные клетки, что делает валиномицин мощным антибиотиком.

ион шестью атомами кислорода карбоксильных групп (рис. 11-45), и работает как челнок, перенося K^+ через мембрану по градиенту концентрации, уменьшая этот градиент. Соединения, которые переносят ионы через мембрану, действуя по типу челнока, называются **ионофорами** («несущие ионы»). И валиномицин, и монензин (ионофор, переносящий Na^+) — антибиотики. Они убивают клетки микробов, останавливая процессы вторичного транспорта и энергозапасующие реакции. Монензин находит широкое применение в качестве противогрибкового и противопаразитарного средства. ■

Аквапорины образуют гидрофильные трансмембранные каналы для переноса воды

К семейству интегральных белков относятся **аквапорины (AQP)**, которые были открыты Питером Эгром. Аквапорины образуют каналы для быстрого движения молекул воды через плазм-

матическую мембрану (в табл. 11-5 приведено несколько примеров). У млекопитающих обнаружено 11 аквапоринов, причем каждый из них имеет специфическую локализацию и выполняет особую роль (табл. 11-5). Эритроциты, которые при поступлении крови через мозговой слой почек быстро набухают или сжимаются в ответ на резкие изменения в осмоляльности окружающей клетки среды, имеют высокое содержание аквапоринов в плазматической мембране ($2 \cdot 10^5$ молекул AQP-1 на клетку). Секреция воды экзокринными железами, в которых образуются пот,



Питер Эгр

Таблица 11-5 Проницаемость и основная локализация аквапоринов млекопитающих			
Аквапорин	Пропускаемое вещество (проницаемость)	Локализация в тканях	Локализация в клетке*
AQP-0	Вода (низкая)	Хрусталик	Плазматическая мембрана
AQP-1	Вода (высокая)	Эритроциты, почки, легкие, эндотелий сосудов, мозг, глаза	Плазматическая мембрана
AQP-2	Вода (высокая)	Почки, семявыносящие протоки	Апикальная плазматическая мембрана, внутриклеточные везикулы
AQP-3	Вода (высокая), глицерин (высокая), мочевины (изменяемая)	Почки, кожа, легкие, глаза, толстая кишка	Базолатеральная плазматическая мембрана
AQP-4	Вода (высокая)	Мозг, мышцы, почки, легкие, желудок, тонкая кишка	Базолатеральная плазматическая мембрана
AQP-5	Вода (высокая)	Слюнные железы, слезные железы, потовые железы, легкие, роговица глаз	Апикальная плазматическая мембрана
AQP-6	Вода (низкая), анионы (NO_3^- > Cl^-)	Почки	Внутриклеточные везикулы
AQP-7	Вода (высокая), глицерин (высокая), мочевины (высокая), арсенит-ион	Жировая ткань, почки, семенники	Плазматическая мембрана
AQP-8**	Вода (высокая)	Семенники, почки, печень, поджелудочная железа, тонкая и толстая кишки	Плазматическая мембрана, внутриклеточные везикулы
AQP-9	Вода (низкая), глицерин (высокая), мочевины (высокая), арсенит-ион	Толстая кишка, лейкоциты, мозг, семенники	Плазматическая мембрана
AQP-10	Вода (низкая), глицерин (высокая), мочевины (высокая)	Тонкая кишка	Внутриклеточные везикулы

Источник: King, L.S., Kozono, D., & Agre, P (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev.* 5, 688.

* Для аквапоринов, которые постоянно присутствуют в апикальной или базолатеральной мембранах, отмечена локализация в одной из этих мембран; для содержащихся в обеих мембранах указана локализация в плазматической мембране.

** AQP-8 может, кроме того, пропускать мочевины.

слюна и слезы, происходит при участии аквапоринов. В образовании мочи и удерживании воды в нефронах (функциональных единицах почек) участвуют семь разных аквапоринов. Каждый почечный аквапорин локализован в нефроне специфическим образом, каждый имеет особые свойства и регуляторные особенности. Например, AQP-2 в эпителиальных клетках почечных канальцев регулируется вазопрессинном (другое название — антидиуретический гормон): чем больше концентрация вазопрессина, тем больше воды реабсорбируется в почках. У мутантных мышей,

не имеющих гена AQP-1, образуется очень много мочи (полиурия), а способность концентрировать мочу уменьшается из-за снижения проницаемости для воды проксимальных канальцев. Известно, что генетические дефекты аквапоринов у человека являются причиной различных заболеваний, включая сравнительно редкую форму диабета, сопровождающегося полиурией (доп. 11-2).

Аквапорины обнаружены у всех живых организмов. У растения *Arabidopsis thaliana* 38 генов, которые кодируют различные типы аквапоринов, что отражает решающую роль движения воды в

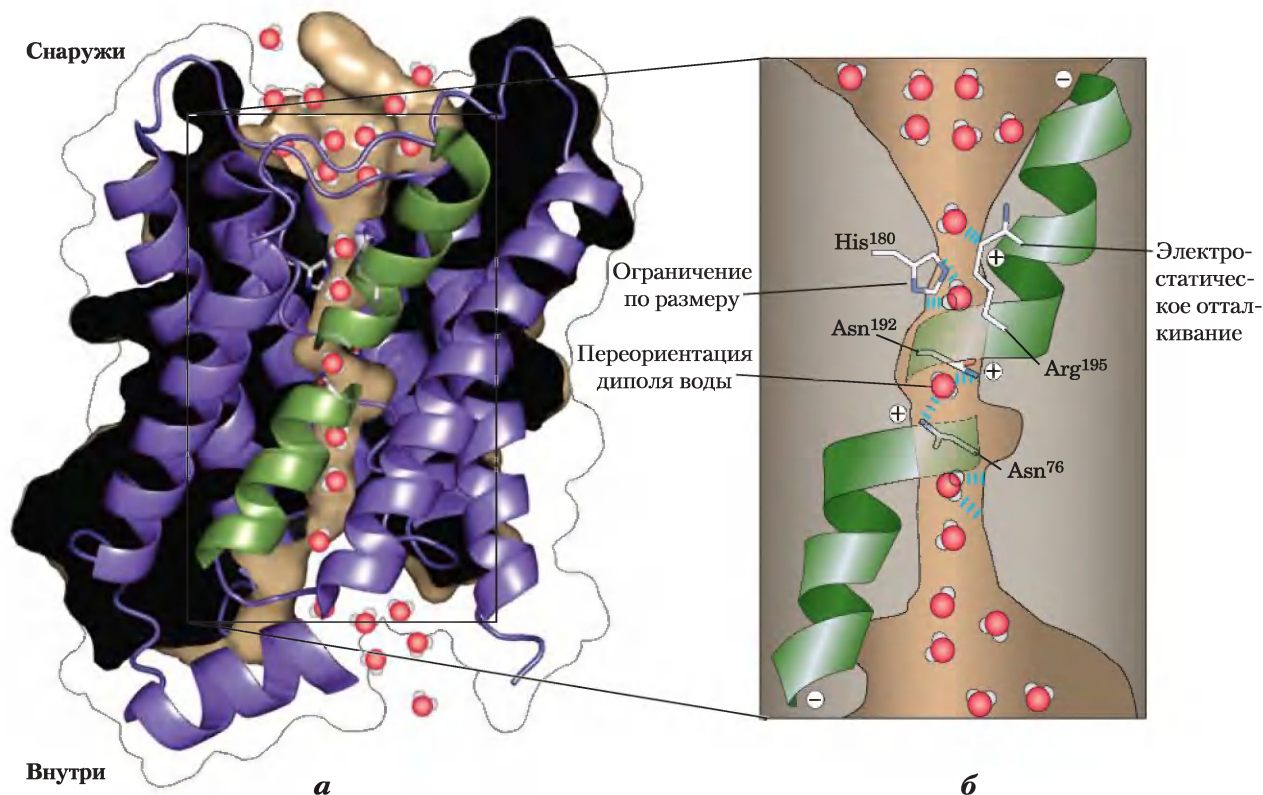


Рис. 11-46. Аквапорин. Этот белок — тетрамер, состоящий из четырех идентичных мономеров, каждый из которых образует трансмембранную пору. а) Мономер аквапорина шпината *SoPIP2;1* (по PBD ID 2B5F), проекция на плоскость мембраны. Спирали образуют центральную пору, а два коротких спиральных сегмента (зеленые) взаимодействуют с последовательностями Asn-Pro-Ala (NPA), которые формируют часть водного канала и обнаружены во всех аквапориных. б) Схема строения аквапорина 1 быка (по PBD ID 1J4N). Пора (коричневая), заполненная молекулами воды (красно-белые шарики), сужается у остатка His¹⁸⁰ до диаметра 2,8 Å (просвет поры примерно равен размеру молекулы воды), препятствуя прохождению молекул крупнее воды. Положительный заряд на Arg¹⁹⁵ предотвращает проникновение через пору катионов, в частности H₃O⁺. Две короткие спирали (показаны зеленым) обращены положительным концом своего диполя к поре, что помогает переориентировать молекулы воды по мере прохождения по каналу; это разрушает цепочки из молекул воды, связанных водородными связями, предотвращая перенос протона по механизму «протонных прыжков» (см. рис. 2-13).

физиологии растений. Изменения в тургорном давлении, например, требуют быстрого передвижения воды через мембрану (см. с. 85).

Молекулы воды проходят через канал AQP-1 со скоростью $\sim 10^9$ с⁻¹. Для сравнения, самое высокое число оборотов известно для фермента каталазы, и оно составляет $4 \cdot 10^7$ с⁻¹, а у большинства ферментов число оборотов — от 1 до 10^4 с⁻¹ (табл. 6-7). Низкая энергия активации для перехода воды через аквапориновые каналы ($\Delta G^* < 15$ кДж/моль) наводит на мысль, что вода движется через каналы непрерывным потоком по осмотическому градиенту (об осмосе см. с. 85). Существенно, что аквапорины не допускают транспорта протонов (ионов гидроксония H_3O^+) через мембрану, что лишило бы мембрану электрохимических потенциалов. И они не перемещаются. Откуда у аквапоринов такая исключительная селективность?

Ответ мы находим в структуре AQP-1, которая была установлена методом рентгеноструктурного анализа. Молекула AQP-1 (рис. 11-46, а) состоит из четырех идентичных мономеров (для каждого $M_r = 28\ 000$), каждый мономер образует трансмембранную пору с таким диаметром, чтобы пропускать молекулы воды «колонной по одному». Каждый мономер состоит из шести спиральных трансмембранных участков и двух более коротких спиралей, причем обе содержат последовательность Asn-Pro-Ala (NPA). Шесть трансмембранных спиралей образуют пору по длине мономера, а две короткие пегли, содержащие последовательность NPA, направлены к середине бислоя с разных его сторон, образуя «фильтр специфичности» — структуру, которая позволяет проходить только молекулам воды (рис. 11-46, б).

В центре мембраны водный канал сужается до диаметра 2,8 Å, что строго ограничивает диаметр молекул, способных проникать через канал. Положительный заряд консервативного остатка Arg в этом узком месте предотвращает проникновение катионов, в частности H_3O^+ . Остатки, которые выстилают канал, каждого мономера AQP-1, обычно неполярны. Но карбонильные атомы кислорода в остане пептида, выступая то там, то здесь в узкую часть канала, могут образовывать водородные связи с отдельными молекулами проходящей воды; два остатка Asn (Asn⁷⁶ и Asn¹⁹²) в петлях NPA также связываются с водой водородными связями. Эта модель канала не учи-

тывает случай, когда молекулы воды настолько сближены друг с другом, что можно говорить о возникновении цепочных структур и о механизме перескока протонов через мембрану (см. рис. 2-13). Остатки Arg и His, а также электрические диполи, возникающие на коротких спиральных NPA-петель, обеспечивают положительный поверхностный заряд, отталкивающий протоны, не давая им проникнуть через пору, и, кроме того, предотвращая образование водородных связей между соседними молекулами воды.

Аквапорин, выделенный из шпината, является управляемым каналом и находится в открытом состоянии, когда два остатка Ser на обращенном внутрь клетки конце канала фосфорилированы, и в закрытом состоянии, когда они дефосфорилированы. Этот белок был изучен в обоих состояниях методом РСА. Фосфорилирование способствует образованию конформации, в которой два соседних остатка Leu и His оказываются вдавленными внутрь канала, что блокирует продвижение воды дальше этого места и эффективно перекрывает канал. Действие других аквапоринов регулируется по-другому, но всегда достигается быстрое изменение проницаемости мембраны для молекул воды.

Обычно аквапорины пропускают только воду, однако некоторые из них с высокой скоростью пропускают глицерин и мочевины (табл. 11-5). Считается, что эти аквапорины играют важную роль в метаболизме глицерина. Например, AQP-7, обнаруженный в плазматической мембране адипоцитов (жировых клеток), эффективно транспортирует глицерин. У мышей с дефектом AQP-7 развивается ожирение, а во взрослом состоянии — диабет, по-видимому, вследствие невозможности переносить глицерин в адипоциты или из них при превращении триацилглицеридов в жирные кислоты и глицерин, и наоборот.

Ион-селективные каналы делают возможным быстрое перемещение ионов через мембраны

Ион-селективные каналы, впервые обнаруженные в нейронах и присутствующие, как теперь известно, в плазматических мембранах всех клеток, а также во внутриклеточных мембранах эукариот, имеют другой механизм переноса неорганических ионов через мембраны. Ионные каналы вместе с ионными насосами, такими как Na^+/K^+ -АТРаза, определяют проницаемость плаз-

матической мембраны в отношении специфических ионов и регулируют концентрацию ионов в цитозоле и мембранный потенциал. В нейронах очень быстрые изменения в ионных каналах вызывают изменения мембранного потенциала (потенциала действия), которые передают сигналы с одного конца нейрона на другой. В миоцитах быстрое открытие Ca^{2+} -каналов в саркоплазматическом ретикулуме высвобождает ионы Ca^{2+} , которые запускают сокращение мышц. Мы обсудим сигнальную роль ионных каналов в гл. 12. Здесь опишем структурную основу функционирования ионного канала, используя в качестве примеров бактериальный K^+ -канал, Na^+ -канал нейронов и ионный канал ацетилхолинового рецептора.

Ионные каналы отличаются от белков-переносчиков по крайней мере тремя свойствами. Во-первых, скорость транспорта через каналы может быть на несколько порядков больше, чем с помощью переносчика; ионный канал пропускает 10^7 – 10^8 ионов/с, что составляет почти теоретический максимум для диффузии. Во-вторых, ионные каналы ненасыщаемы: скорость транспорта не выходит на плато при высокой концентрации субстрата. В-третьих, они управляемы — открываются или закрываются в ответ на некоторые события в клетке. В **лигандзависимых каналах** (которые обычно построены из олигомеров) связывание малых молекул вне или внутри клетки вызывает аллостерический переход в белке, который открывает или закрывает канал. В **потенциалзависимых ионных каналах** изменение трансмембранного электрического потенциала (V_m) вызывает смещение заряженного домена белка относительно мембраны, при этом ионный канал открывается или закрывается. Оба типа регуляции могут быть очень быстрыми. Обычно канал открывается за доли миллисекунды и остается открытым только в течение миллисекунд, делая это молекулярное устройство эффективным для очень быстрой передачи сигнала в нервной системе.

Работу ионного канала можно изучать, измеряя электрические параметры

Поскольку один ионный канал остается открытым только в течение миллисекунд, его работу нельзя изучать при помощи большинства обычных биохимических экспериментов. Поэтому



Рис. 11-47. Электрические измерения при изучении функций ионного канала. «Активность» ионного канала оценивается путем измерения тока ионов через него с использованием методики пэтч-кламп. Пипеткой (микропипеткой) с тонко оттянутым кончиком надавливают на клеточную поверхность, в пипетке создается отрицательное давление и возникает герметичное соединение между пипеткой и мембраной. Так удается оторвать крошечный кусочек (пэтч) мембраны (который может содержать один или несколько каналов). Если поместить пипетку и находящийся на ее кончике пэтч в водный раствор, можно измерить активность канала по электрическому току, протекающему между содержимым пипетки и водным раствором. Практически таким же образом создается электрический контур, в контуре поддерживается определенный потенциал, соответствующий трансмембранному, и измеряют ток, равный этому напряжению. С помощью высокочувствительных детекторов можно измерять ток, протекающий через один ионный канал и составляющий обычно несколько пикоампер. При регистрации тока во времени (в миллисекундах) можно определить, насколько быстро канал открывается и закрывается, как часто он открывается и как долго остается открытым. Измерения при разных V_m позволяют оценить влияние мембранного потенциала на работу канала.

ионные токи измеряют либо как изменения потенциалов V_m (в милливольтной области), либо как электрический ток I (в микроамперах или пикоамперах) с применением микроэлек-



Эрвин Неер



Берт Закман

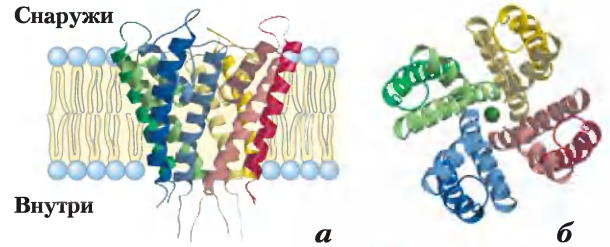
тродов и соответствующих усилителей. В методе пэтч-кламп, разработанном Эрвином Неером и Бертом Закманом в 1976 г., измеряются очень малые токи через крошечную область мембранной поверхности, содержащую всего только одну или несколько молекул ионных каналов (рис. 11-47). Исследователь может измерить величину тока и продолжительность его импульса за одно открытие ионного канала и определить частоту открывания канала и влияние на эту частоту трансмембранного потенциала, регуляторных лигандов, токсинов и других агентов. Исследования методом пэтч-кламп показали, что 10^4 ионов могут передвигаться через единственный ионный канал за 1 мс. Такой ионный ток обусловлен гигантским усилением первоначального сигнала; например, для открытия канала ацетилхолинового рецептора нужны только две молекулы ацетилхолина (см. ниже).

Строение K^+ -канала обусловлено его специфичностью

Структура калиевого канала бактерии *Streptomyces lividans* была установлена Родериком Маккинном в 1998 г. методом рентгеноструктур-



Родерик Маккиннон

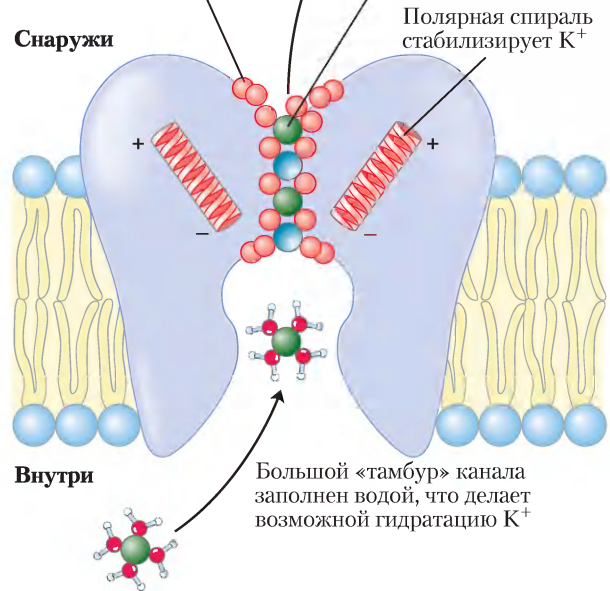


Снаружи
Внутри

а

Карбонильные кислороды полипептидных цепей образуют канал, точно соответствующий по размеру иону K^+ , и замещают гидратную воду его внутренней сферы

Вдоль канала четыре места для ионов K^+ (голубые или зеленые шарики)



Ион K^+ , окруженный молекулами воды

Рис. 11-48. K^+ -канал *Streptomyces lividans* (PDB ID 1BL8). а) Показано расположение канала в мембране. Канал из восьми трансмембранных спиралей (по две от каждой из четырех идентичных субъединиц) образует конус, широкий конец которого направлен во внеклеточное пространство. Внутренние спирали конуса (более бледная окраска) выстилают трансмембранный канал, а внешние спирали взаимодействуют с липидным бислоем. Короткие сегменты от каждой субъединицы сходятся на открытом конце конуса, образуя фильтр селективности. б) С поверхности мембраны видны четыре субъединицы, расположенные по окружности канала, достаточно широкого для того, чтобы пропускать единственный ион K^+ . в) Схема K^+ -канала в поперечном сечении; показаны структурные особенности, важные для работы канала (см. также рис. 11-49).

ного анализа. Благодаря этому удалось понять, каким образом канал работает. Этот бактериальный ионный канал по аминокислотной последовательности родственен всем другим известным K^+ -каналам, включая потенциалзависимый K^+ -канал нейронов. Среди членов этого семейства белков наибольшее сходство аминокислотных последовательностей наблюдается в «области поры», которая содержит фильтр ионной селективности, позволяющий ионам K^+ (радиус 1,33 Å) проходить в 10 000 раз быстрее ионов Na^+ (радиус 0,95 Å), — со скоростью около 10^8 ионов/с, что приближается к теоретическому пределу диффузии.

K^+ -канал состоит из четырех идентичных субъединиц, которые пронизывают мембрану и образуют конус внутри конуса с двойными стенками, при этом широкий конец двойного конуса направлен во внеклеточное пространство (рис. 11-48). Каждая субъединица имеет две трансмембранные α -спирали, а также третью, более короткую спираль, которая принимает участие в формировании поры. Внешний конус образуется одной из трансмембранных спиралей каждой субъединицы. Внутренний конус, образованный четырьмя другими трансмембранными спиралью, выстилает ионный канал и поддерживает фильтр ионной селективности.

И высокую ионную специфичность, и интенсивный поток ионов через канал можно объяснить на основании наших знаний о строении канала. На внешней и внутренней поверхностях плазматической мембраны входы в канал содержат несколько отрицательно заряженных аминокислотных остатков, которые, вероятно, увеличивают локальную концентрацию катионов, таких как K^+ и Na^+ . Путь иона через мембрану начинается (на внутренней поверхности) через широкий вход, заполненный водой, где ион может сохранять свою гидратную оболочку. Дальнейшая стабилизация обусловлена наличием в области поры коротких α -спиралей от каждой субъединицы, при этом частичные отрицательные заряды их электрических диполей «нацелены» на K^+ в канале. На расстоянии, составляющем около двух третей пути через мембрану, канал сужается в области фильтра селективности, заставляя ион сбрасывать молекулы гидратной воды. Атомы карбонильного кислорода в фильтре селективности ионов K^+ замещают молекулы воды в

гидратной оболочке, что облегчает транспорт K^+ . Такое выгодное взаимодействие с фильтром селективности невозможно для ионов Na^+ — они слишком малы для координации кислородных лигандов. Именно благодаря преимущественной стабилизации K^+ в канале предпочтительна эта конформация, она выполняет функцию фильтра селективности, но мутации, которые изменяют аминокислотные остатки в этом сайте белка, лишают канал ионной селективности. Участки фильтра, ответственные за связывание ионов K^+ , устроены достаточно гибко, чтобы сужаться до размеров ионов Na^+ , входящих в канал; при этом происходят конформационные изменения, в результате которых канал переключается.

На фильтре селективности расположены четыре потенциальных K^+ -связывающих центра, каждый образован из кислородной «ячейки», которая предоставляет лиганды для ионов K^+ (рис. 11-49). В структуре фильтра селектив-

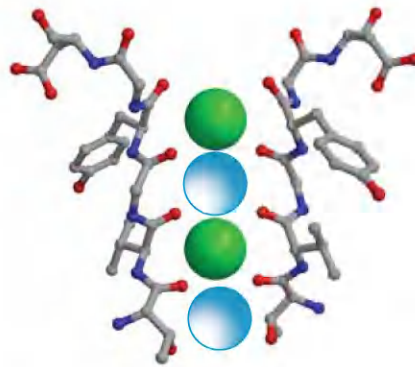


Рис. 11-49. K^+ -связывающие сайты в поре (фильтре) селективности K^+ -канала (PDB ID 1J95). Карбонильные атомы кислорода (красный цвет) пептидного остова в поре селективности «высовываются» в канал, взаимодействуя с проходящим ионом K^+ и стабилизируя его. Эти лиганды расположены самым оптимальным образом для того, чтобы взаимодействовать с каждым из четырех ионов K^+ , но не взаимодействовать с меньшими по размеру ионами Na^+ . Это преимущественное взаимодействие с K^+ является основой ионной селективности. Взаимное отталкивание между ионами K^+ приводит к тому, что одновременно бывают заняты только два из четырех центров (два зеленых или два голубых), но один ион K^+ не может закрепиться на одном центре. Совместный эффект связывания K^+ с карбонильным кислородом и отталкивания между ионами K^+ гарантирует, что ион продолжит движение, изменяя свое положение за время 10–100 нс, и что большие энергетические барьеры для прохождения иона его пути через мембрану отсутствуют.

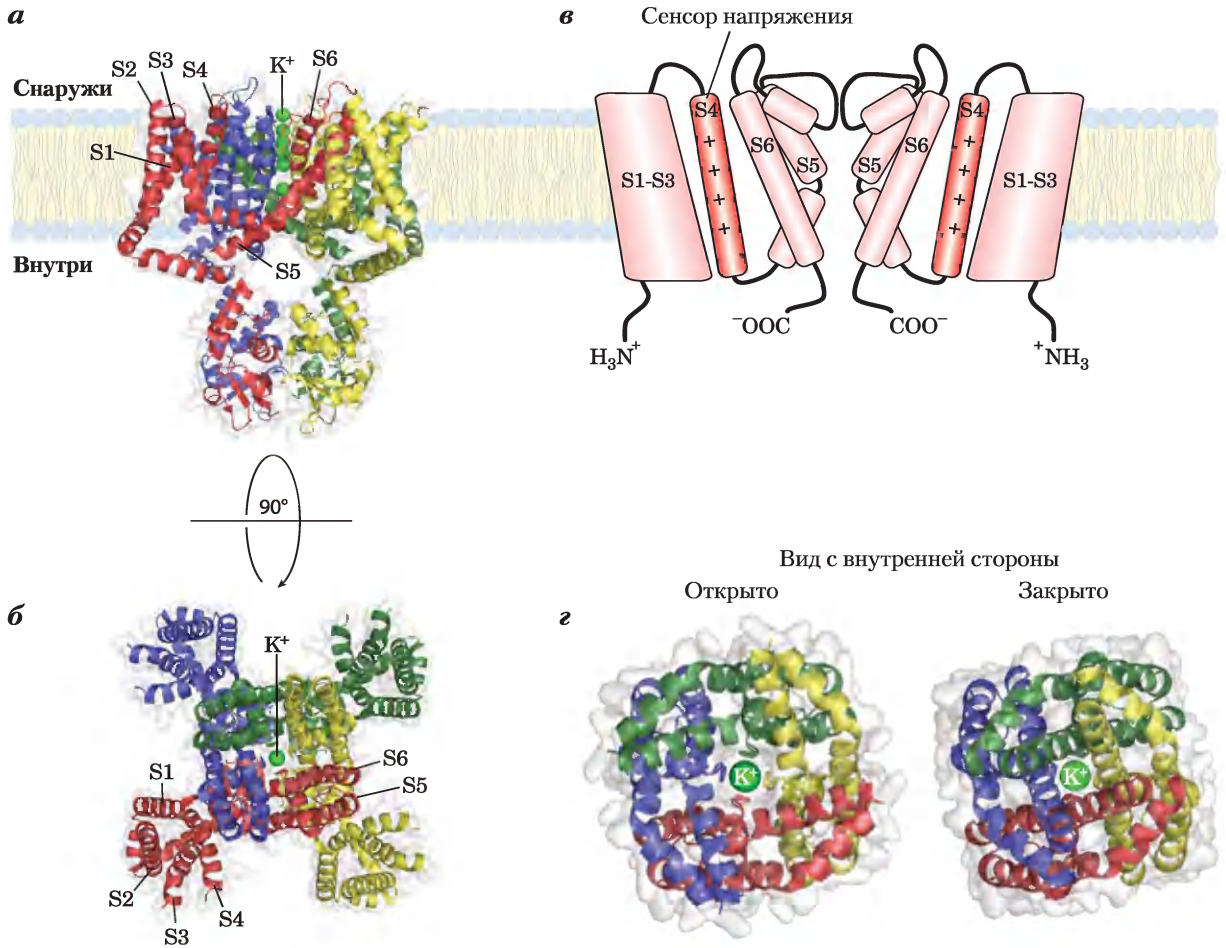


Рис. 11-50. Структура потенциалзависимых калиевых каналов (PDB ID 2A79) Кристаллическая структура комплекса Kv1.2-β2 из мозга крысы отражает основное строение K^+ -канала (см. рис. 11-48) и всех дополнительных элементов, обеспечивающих чувствительность канала к изменениям мембранного потенциала: четырех трансмембранных спиральных участков каждой субъединицы и четырех β-субъединиц. Канал пронизывает мембрану (а), вид сверху (б), как на рис. 11-48, причем каждая субъединица окрашена в свой цвет, а каждая из четырех β-субъединиц в тот же цвет, что и субъединица, с которой она связана. б) Все трансмембранные спирали одной субъединицы (красной субъединицы) пронумерованы от S1 до S6. Субъединицы S5 и S6 из каждой из четырех субъединиц образуют сам канал и соответствуют двум трансмембранным спиральям из каждой субъединицы на рис. 11-48. Спираль S4 содержит консервативный остаток Arg и считается главным движущим элементом потенциалчувствительного механизма. в) Схема потенциалзависимого канала с центральными порами и дополнительными структурами, обеспечивающими чувствительность канала к изменениям потенциала. Содержащая консервативный остаток Arg, спираль S4 обозначена оранжевым цветом. Для простоты β-субъединицы в данной проекции не показаны. Обычно трансмембранный электрический потенциал (отрицательный внутри клетки) воздействует на положительно заряженные боковые цепи остатка Arg в S4 со стороны цитозоля. При деполяризации мембраны напряжение ослабевает, а при полном обращении мембранного потенциала спираль S4 вытягивается во внеклеточное пространство. г) Эти перемещения S4 сопряжены с открыванием и закрыванием калиевого канала. Хотя в закрытом канале присутствуют ионы K^+ , дно поры со стороны цитозоля закрыто, что предотвращает прохождение ионов.

ности видны два иона K^+ на расстоянии $\sim 7,5 \text{ \AA}$ друг от друга, две молекулы воды занимают пустоты между ними. Ионы K^+ проходят через фильтр «колонной по одному»; как раз их взаимное электростатическое отталкивание наиболее вероятно уравнивает взаимодействие каждого иона с фильтром селективности и обеспечивает их движение. Транспорт двух ионов K^+ происходит согласованно: сначала они занимают положения 1 и 3, затем перескакивают в положения 2 и 4 (рис. 11-48, в). Энергетическое различие между этими двумя конфигурациями ($1/3$ и $2/4$) очень мало. Энергетически пора селективности не «чередa холмов и долин», а плоская поверхность, которая идеальна для быстрого движения иона через канал. Структура канала, по-видимому, оптимизировалась в процессе эволюции и обеспечивает максимальные скорости ионных потоков и высокую специфичность.

Потенциалзависимые калиевые каналы имеют более сложное строение по сравнению с тем, что изображено на рис. 11-48, но основные элементы те же. Например, потенциалзависимые каналы млекопитающих, относящиеся к семейству *Shaker*, представляют собой анионные каналы, аналогичные показанному на рис. 11-48 бактериальному каналу, но содержат дополнительные белковые домены, чувствительные к мембранному потенциалу, которые перемещаются в ответ на изменение потенциала и при этом вызывают открытие или закрытие K^+ -канала (рис. 11-50). Наиболее важная трансмембранная спираль потенциалчувствительного домена калиевого канала из семейства *Shaker* содержит четыре остатка Arg. Положительные заряды на этих остатках заставляют спираль перемещаться по мембране в ответ на изменение электрического поля (мембранного потенциала).

Кроме того, в клетках есть ионные каналы, которые избирательно пропускают ионы Na^+ или Ca^{2+} , но не пропускают ионы K^+ . В каждом случае селективность ионных каналов зависит от наличия в участке связывания кармана правильного размера (не слишком большого, но и не слишком маленького) для размещения определенного иона; кроме того, в этом кармане должны быть правильным образом ориентированы карбоксильные атомы кислорода, способные вытеснить

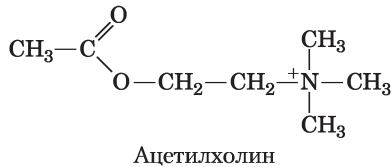
гидратную оболочку иона. Такого соответствия можно достичь и с более мелкими молекулами, чем белки. Например, валиномицин (рис. 11-45) обладает выраженной специфичностью при связывании определенных ионов. Химики создали небольшие молекулы, которые с чрезвычайно высоким сродством связывают ионы лития (радиус $0,60 \text{ \AA}$), натрия ($0,95 \text{ \AA}$), калия ($1,33 \text{ \AA}$) или рубидия ($1,48 \text{ \AA}$). Однако биологические структуры — каналные белки — не только специфическим образом *связывают* ионы, но и *переносят* их через мембрану.

Потенциалзависимые ионные каналы играют ключевую роль в работе нейронов

Практически любая быстрая передача сигнала между нейронами и тканями (например, мышечной тканью) осуществляется посредством быстрого открытия и закрытия ионных каналов в плазматической мембране. Например, натриевые каналы в плазматической мембране нейронов чувствуют мембранный потенциал и открываются или закрываются в ответ на его изменения. Эти потенциалзависимые каналы обычно избирательны по отношению к ионам натрия по сравнению со всеми другими однозарядными или двухзарядными катионами (которые проходят через эти каналы в 100 раз реже, чем ионы натрия) и обеспечивают очень высокую скорость потока ($> 10^7$ ионов/с). В норме (в состоянии покоя) Na^+ -каналы активируются (открываются) при падении мембранного потенциала, а далее подвергаются очень быстрой инактивации. Открытыми каналы бывают очень короткое время — порядка считанных миллисекунд, а закрытыми (неактивированными) гораздо дольше — несколько миллисекунд. На активации и инактивации натриевых каналов основана передача нервных импульсов (см. рис. 12-25).

Другой хорошо изученный ионный канал — **никотиновый ацетилхолиновый рецептор**, который участвует в передаче электрического сигнала от мотонейрона на мышечное волокно в нейромышечном соединении (подает сигнал мышце, что пора сокращаться). (Никотиновые рецепторы первоначально отличали от мускариновых рецепторов по чувствительности первых к никотину, вторых — к алкалоиду из грибов му-

скарину. Они различаются также по структуре и функциям.) Ацетилхолин, выделенный мотонейроном, диффундирует на расстояние нескольких микрометров в плазматическую мембрану миоцита, где он связывается с ацетилхолиновым рецептором. Это вызывает конформационные изменения в рецепторе, которые служат причиной открывания его ионного канала. Результирующее движение положительных зарядов внутрь деполяризует плазматическую мембрану, вызывая сокращение. Ацетилхолиновый рецептор позволяет Na^+ , K^+ и Ca^{2+} перемещаться через мембрану с одинаковой легкостью, но другие катионы и все анионы не способны к перемещению. Движение Na^+ через ионный канал ацетилхолинового рецептора является ненасыщаемым (скорость изменяется пропорционально изменению концентрации внеклеточного натрия $[\text{Na}^+]$) и очень быстрым — около $2 \cdot 10^7$ ионов/с при физиологических условиях.



Ацетилхолиновый рецепторный канал — типичный представитель многих других ионных каналов, которые продуцируют электрические сигналы или отвечают на них: у него есть «ворота», которые открываются в ответ на стимуляцию сигнальной молекулой (в нашем случае это ацетилхолин), и внутренний «таймер», который закрывает ворота через доли секунды. Таким образом, ацетилхолиновый сигнал кратковременный — необходимое свойство любого электрического сигнала.

На основе сходства между аминокислотными последовательностями других химически управляемых ионных каналов и ацетилхолинового рецептора рецепторные каналы, отвечающие на действие внеклеточных сигнальных веществ — γ -аминомасляной кислоты (ГАМК), глицина и серотонина, классифицируются как относящиеся к суперсемейству ацетилхолинового рецептора и, вероятно, имеют одинаковую трехмерную структуру и механизм, регулирующий открывание канала. ГАМК_A и глициновые рецепторы — это анионные каналы, специфич-

ные для Cl^- и HCO_3^- , а серотониновый рецептор, подобно ацетилхолиновому, катионспецифичный.

Другой класс лигандзависимых ионных каналов отвечает на действие внутриклеточных лигандов: 3',5'-циклического гуанозинмононуклеотида (сGMP) в глазу позвоночных, сGMP и сAMP в обонятельных нейронах и инозит-1,4,5-трисфосфата (IP_3) во многих типах клеток. Эти каналы составлены из множественных субъединиц, в каждом по шесть трансмембранных спиральных доменов. Мы обсудим сигнальные функции этих ионных каналов в гл. 12.

Механизмы работы некоторых переносчиков, приведенных в табл. 11-6, рассмотрены ниже.

Дефектные ионные каналы могут приводить к неблагоприятным физиологическим последствиям



Важность ионных каналов для физиологических процессов становится ясной по эффектам от мутаций в специфических каналообразующих белках (табл. 11-7, доп. 11-3). Генетические дефекты в потенциалзависимом Na^+ -канале плазматической мембраны миоцита приводят к болезням — периодическому мышечному параличу (как при гиперкалиемической форме пароксизмальной миоплегии) и длительным спазмам мышц (как при врожденной парамиотонии). Как было упомянуто ранее, кистозный фиброз обусловлен мутацией, которая изменяет одну аминокислоту в белке CFTR, Cl^- -ионном канале; в этом случае нарушается не передача нервного импульса, а секреция клетками различных экзокринных желез, активность которых сопряжена с ионами Cl^- .

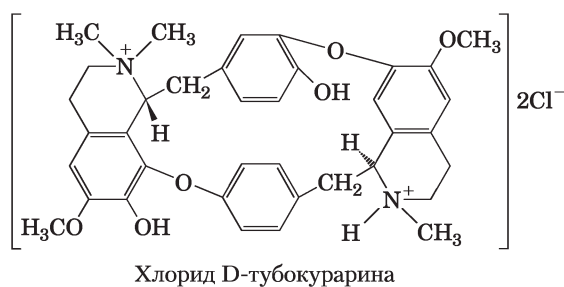
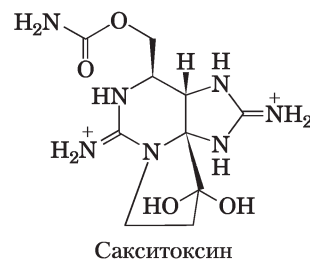
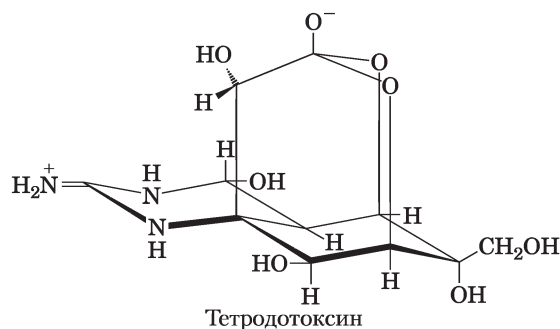
Многие природные токсины действуют на ионные каналы, и при исследовании этих токсинов было наглядно показано важное значение нормального функционирования ионных каналов. Тетродотоксин (вырабатывается рыбами иглобрюхами, *Sphaeroides rubripes*) и сакситоксин (вырабатывается морскими панцирножгутиковыми р. *Gonyaulax*, которые вызывают «красный прилив») оказывают действие при связывании с потенциалзависимыми Na^+ -каналами нейронов, препятствуя возникновению нормальных потенциалов действия. Из

Таблица 11-6 Транспортные системы, описанные в данной книге		
Транспортная система и ее локализация	Номер рисунка	Функция
Антипортер адениннуклеотида внутренней мембраны митохондрий	19-28	Импортирует ADP (как субстрат) для окислительного фосфорилирования и экспортирует АТФ (как продукт)
Ацилкарнитин/карнитиновый транспортер внутренней мембраны митохондрий	17-6	Импортирует жирные кислоты в матрикс для β -окисления
P_i /H-симпортер внутренней мембраны митохондрий	19-28	Поставляет P_i для окислительного фосфорилирования
Малат/ α -кетоглутаратный транспортер внутренней мембраны митохондрий	19-29	Переносит восстанавливающие эквиваленты (в виде малата) из матрикса в цитозоль
Глутамат/аспаратный транспортер внутренней мембраны митохондрий	19-29	Заканчивает перенос, начатый малат/ α -кетоглутаратным челноком
Транспортер цитрата внутренней мембраны митохондрий	21-10	Поставляет в цитозоль цитрат как источник ацетил-СоА для синтеза липидов
Транспортер пирувата внутренней мембраны митохондрий	21-10	Часть механизма переноса цитрата из матрикса в цитозоль
Транспортер жирных кислот плазматической мембраны миоцитов	17-3	Импортирует жирные кислоты для использования в качестве топлива
Протонный насос комплексов I, III, IV внутренней мембраны митохондрий	19-6	Действует как энергозапасующий механизм при окислительном фосфорилировании, превращая поток электронов в протонный градиент
Термогенин (белок-разобщитель), протонная пора внутренней мембраны митохондрий	19-34, 23-35	Сбрасывает протонный градиент в митохондриях в качестве механизма термогенеза и/или ликвидации избыточного топлива
Комплекс цитохрома <i>bf</i> , протонный насос тилакоидных мембран хлоропластов	19-59	Работает как протонный насос, приводимый в действие электронным потоком по Z-схеме; источник протонного градиента для фотосинтетического образования АТФ
Бактериородопсин, свету управляемый протонный насос	19-66	Свету управляемый источник протонного градиента для синтеза АТФ у галофильных бактерий
F_0F_1 АТРаза/АТФ-синтаза внутренней мембраны митохондрий, тилакоидных мембран хлоропластов и бактериальной плазматической мембраны	19-64	Взаимопревращает энергию протонного градиента и АТФ при окислительном и фотофосфорилировании
P_i /триозофосфатный антипортер внутренней мембраны хлоропласта	20-15, 20-16	Экспортирует продукт фотосинтеза из стромы; импортирует P_i для синтеза АТФ
Бактериальный белковый транспортер	27-44	Экспортирует секретируемые белки через плазматическую мембрану
Белковая транслоказа эндоплазматического ретикулаума	27-38	Переносит в ЭР белки, предназначенные для плазматической мембраны, секреции или органелл
Транслоказа белков ядерной поры	27-42	Переносит белки между ядром и цитоплазмой
Рецептор ЛПНП в плазматической мембране животных клеток	21-42	Путем вызываемого рецепторами эндоцитоза импортирует липид-переносящие частицы
Глюкозный транспортер плазматической мембраны животных клеток; регулируется инсулином	12-16	Увеличивает способность мышечной и жировой ткани удалять избыток глюкозы из крови
IP_3 -зависимый Ca^{2+} -канал эндоплазматического ретикулаума	12-10	Делает возможной передачу сигнала путем изменений концентрации Ca^{2+} в цитозоле
cGMP-зависимый Ca^{2+} -канал колбочек и палочек сетчатки	12-36	В глазу позвоночных делает возможной передачу сигнала через родопсин, связывающийся с cAMP-фосфодиэстеразой
Потенциалзависимый Na^+ -канал нейрона	12-25	Создает потенциалы действия при передаче нервного импульса

Таблица 11-7 Некоторые заболевания, возникающие из-за дефектов ионных каналов

Ионный канал	Поврежденный ген	Заболевание
Na ⁺ (потенциалзависимый, скелетная мышца)	<i>SCN4A</i>	Гиперкалиемическая форма пароксизмальной миоплегии (или врожденная парамиотония)
Na ⁺ (потенциалзависимый, нейроны)	<i>SCN1A</i>	Генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами
Na ⁺ (потенциалзависимый, сердечная мышца)	<i>SCN5A</i>	Синдром 3 удлинения QT
Ca ²⁺ (нейроны)	<i>CACNA1A</i>	Семейная гемиплегическая мигрень
Ca ²⁺ (потенциалзависимый, сетчатка)	<i>CACNA1F</i>	Врожденная постоянная ночная слепота
Ca ²⁺ (полицистин-10)	<i>PKD1</i>	Поликистозная болезнь почки
K ⁺ (нейроны)	<i>KCNQ4</i>	Доминантная тугоухость
K ⁺ (потенциалзависимый, нейроны)	<i>KCNQ2</i>	Наследственные доброкачественные судороги новорожденных
Неспецифический катионный (сGMP-регулируемый, сетчатка)	<i>CNCG1</i>	Пигментация сетчатки
Ацетилхолиновый рецептор (скелетные мышцы)	<i>CHRNA1</i>	Врожденный миастенический синдром
Cl ⁻	<i>CFTR</i>	Кистозный фиброз

иглобрюхов готовят японский деликатес фугу, но могут его готовить только повара, специально обученные отделять сочные съедобные кусочки от смертельно ядовитых. Употребление в пищу моллюсков и ракообразных, вскормленных на р. *Gonyaulax*, также может быть смертельно опасным; моллюски нечувствительны к сакситоксину, но накапливают его в мышцах, которые становятся страшно ядовитыми для организмов, стоящих более высоко в пищевой цепи. Яд черной мамбы содержит дендротоксин, который мешает работе потенциалзависимых K⁺-каналов. Турбокурарин — активный компонент яда кураре (использовался как яд для стрел аборигенами бассейна реки Амазонки) и два других токсина змеиных ядов — кобротоксин и бунгаротоксин — блокируют ацетилхолиновый рецептор или препятствуют открытию его ионного канала. Блокируя сигналы от нервов к мышцам, все эти токсины вызывают паралич и даже смерть. Зато чрезвычайно высокое сродство бунгаротоксина к ацетилхолиновому рецептору ($K_d = 10^{-15}$ M) оказалось полезным для экспериментаторов: радиоактивно меченный токсин использовался для количественного определения рецептора в процессе его очистки. ■



Краткое содержание раздела 11.3

ТРАНСПОРТ ВЕЩЕСТВ ЧЕРЕЗ МЕМБРАНЫ

- Для перемещения полярных соединений и ионов через биологические мембраны необходимы белки-переносчики (транспортёры). Некоторые транспортёры просто облегчают пассивную диффузию через мембрану от более высокой концентрации к более низкой. Другие осуществляют активное движение веществ против электрохимического градиента; такой транспорт должен быть сопряжен с источником метаболической энергии.
 - Переносчики, подобно ферментам, характеризуются насыщенностью и стереоспецифичностью в отношении своих субстратов. Транспорт с участием таких систем может быть как пассивным, так и активным. Первичный активный транспорт осуществляется под действием АТФ или с помощью реакций с переносом электронов; вторичный активный транспорт использует сопряженный перенос двух веществ, одно из которых (часто H^+ или Na^+) перемещается по электрохимическому градиенту, а другое — против градиента.
 - GLUT-транспортёры, такие как GLUT1 эритроцитов, переносят глюкозу в клетки по механизму облегченной диффузии. Эти транспортёры являются унипортерами, перенося только один субстрат. Симпортеры делают возможным одновременный перенос двух веществ в одном направлении; примерами могут служить транспортёр лактозы *E. coli*, приводимый в действие энергией протонного градиента (лактоза/ H^+ -симпортер), и транспортёр глюкозы клеток кишечного эпителия, приводимый в действие градиентом Na^+ (симпорт глюкоза/ Na^+). Антипортеры опосредуют одновременный перенос двух веществ в противоположных направлениях; примерами могут служить хлоридно-бикарбонатный обменник в эритроцитах и повсеместно распространенная Na^+/K^+ -АТРаза.
 - В животных клетках Na^+/K^+ -АТРаза поддерживает разницу между цитозольной и внеклеточной концентрациями Na^+ и K^+ , а резуль-
- тирующий градиент Na^+ используется как источник энергии для самых разнообразных процессов вторичного активного транспорта.
 - Na^+/K^+ -АТРаза плазматической мембраны и Ca^{2+} -транспортёры саркоплазматического и эндоплазматического ретикулумов (насосы SERCA) — примеры АТРаз Р-типа; они подвергаются обратимому фосфорилированию в процессе каталитического цикла и ингибируются аналогом фосфата ванадатом. Относящиеся к АТРадам F-типа протонные насосы (АТФ-синтазы) являются главными для энергосберегающих механизмов в митохондриях и хлоропластах. АТРады V-типа создают градиенты протонов через некоторые внутриклеточные мембраны, в том числе вакуолярные мембраны растений.
 - АВС-транспортёры переносят из клетки наружу разнообразные субстраты, включая многие лекарства, используя АТФ в качестве источника энергии.
 - Ионифоры — это жирорастворимые молекулы, которые связывают специфические ионы и пассивно переносят их через мембраны, рассеивая энергию электрохимических ионных градиентов.
 - Вода переносится через мембраны с помощью аквапоринов. Некоторые аквапорины подвержены регуляции; известны аквапорины, способные также переносить глицерин или мочевины.
 - Ионные каналы создают гидрофильные поры, через которые выбранные ионы могут диффундировать, двигаясь по электрическому (заряд) или химическому (концентрация) градиенту. Ионные каналы обычно ненасыщаемы и обладают очень высокими скоростями потока. Многие ионные каналы высокоспецифичны для одного иона, большинство каналов регулируются либо потенциалом, либо лигандами (химически управляемые). В бактериальных K^+ -каналах фильтр селективности позволяет лигандам с правильной геометрией замещать гидратную воду во внутренней координационной сфере иона K^+ ,

когда этот ион проходит через мембрану. Некоторые K^+ -каналы являются потенциалзависимыми. Ацетилхолиновый рецептор/канал регулируется ацетилхолином, который вызывает тонкие конформационные изменения, открывающие и закрывающие проход через мембрану.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

β-Цилиндр 535
ABC-переносчики 564
 АТРАЗЫ F-типа 563
 АТРАЗЫ P-типа 560
 АТРАЗЫ V-типа 564
АТФ-синтаза 563
FRAP 541
SNARE 548
Аквапорины (AQP) 570
Активный транспорт 553
Амфитропные белки 531
Антипорт 558
Белки слияния 547
Бислой 529
Жидкостно-мозаичная модель 527
 Жидко-разупорядоченное состояние 538
 Жидко-упорядоченное состояние 538
Индекс гидрофобности 534
Интегральные белки 530
Ионный канал 573
Ионофоры 570
 Кавеола 546
 Кавеолин 546
 Каналы 552

Котранспортные системы 558
Мембранный потенциал (V_m) 551
 Микродомены 543
Мицелла 529
 Насос SERCA 560
Облегченная диффузия 552
 Пассивный транспорт 552
 Переносчики 552
Периферические белки 530
Простая диффузия 551
 Рафты 543
Симпорт 558
Скрамблазы 541
Транспортеры 552
Унипорт 558
 Фаза геля 538
Флипазы 541
Флопазы 541
Электрогенный 559
 Электронейтральный 558
Электрохимический градиент 551
Электрохимический потенциал 551

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Состав и строение мембран

Boon, J.M. & Smith, B.D. (2002) Chemical control of phospho-lipid distribution across bilayer membranes. *Med. Res. Rev.* **22**, 251–281.

Обзор среднего уровня сложности, посвященный асимметрии фосфолипидов и факторов, на нее влияющих.

Dowhan, W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipids diversity: why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199–232.

Edidin, M. (2002) Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 414–418.

Краткий обзор, посвященный развитию и подтверждению представлений о бислоевой липидной мембране.

Haltia, T. & Freire, E. (1995) Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1241**, 295–322.

Подробное рассмотрение вторичной и третичной структур мембранных белков и стабилизирующих их факторов.

von Heijne, G. (1994) Membrane proteins: from sequence to structure. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**, 167–192.

Обзор этапов исследования, необходимых для предсказания структуры интегрального белка по его аминокислотной последовательности.

White, S.H., Ladokhin, A.S., Jayasinghe, S., & Hristova, K. (2001) How membranes shape protein structure. *J. Biol. Chem.* **276**, 32395–32398.

Краткое рассмотрение сил, обуславливающих форму трансмембранных спиралей (среднего уровня сложности).

Wimley, W.C. (2003) The versatile β-barrel membrane protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 1–8.

Обзор среднего уровня сложности.

Динамика мембран

Arnaout, M.A., Mahalingam, B., & Xiong, J.-P. (2005) Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 381–410

Brown, D.A. & London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 111–136.

Daleke, D.L. (2007) Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* **282**, 821–825.

Обзор среднего уровня сложности.

Deveaux, P.F., Lopez-Montero, I., & Bryde, S. (2006) Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells. *Chem. Phys. Lipids* **141**, 119–132.

Didier, M., Lenne, P.-F., Rigneault, H., & He, H.-T. (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J.* **25**, 3446–3457.

Обзор среднего уровня сложности об изучении динамики мембран с использованием флуоресцентных и других меток.

Edidin, M. (2003) The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 257–283.

Обзор повышенного уровня сложности.

Frye, L.D. & Edidin, M. (1970) The rapid intermixing of cell-surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* **7**, 319–335.

Классическая демонстрация подвижности мембранных белков.

Graham, T.R. (2004) Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends Cell Biol.* **14**, 670–677.

Обзор среднего уровня сложности о работе флиппаз.

Jahn, R. & Scheller, R.H. (2006) SNAREs — engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Cell Mol. Biol.* **7**, 631–643.

Прекрасный обзор среднего уровня сложности о роли SNARE в слиянии мембран и механизме слияния.

Janmey, P.A. & Kunnunen, P.K.J. (2006) Biophysical properties of lipids and dynamic membranes. *Trends Cell Biol.* **16**, 538–546.

Linder, M.E. & Deschenes, R.J. (2007) Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 74–84.

Marguet, D., Lenne, P.-F., Rigneault, H., & He, H.-T. (2006) Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. *EMBO J.* **25**, 3446–3457.

Среднего уровня сложности обзор методов и результатов исследования молекулярного транспорта в мембране.

Mayer, A. (2002) Membrane fusion in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 289–314.

Обзор повышенного уровня сложности, посвященный слиянию мембран с акцентом на общие характерные черты.

Palsdottir, H. & Hunte, C. (2004) Lipids in membrane protein structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 2–18.

Parton, R.G. (2003) Caveolae—from ultrastructure to molecular mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 162–167.

Краткий исторический обзор по кавеолам, кавеолину и рафтам.

Parton, R.G. & Simons, K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 185–194.

Phillips, S.E., Vincent, P., Rizzieri, K.E., Schaaf, G., & Bankaitis, V.A. (2006) The diverse biological functions of phosphatidylinositol transfer proteins in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**, 21–49.

Обзор повышенного уровня сложности о роли этих белков в липидной сигнализации и миграции мембран.

Pomorski, T., Holthuis, J.C.M., Herrmann, A., & van Meer, G. (2004) Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J. Cell Sci.* **117**, 805–813.

Sprong, H., van der Sluijs, R., & van Meer, G. (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 504–513.

Обзор среднего уровня сложности.

Tamm, L.K. (ed.). (2005) *Protein-Lipid Interactions: From Membrane Domains to Cellular Networks*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

van Deurs, B., Roepstorff, K., Hommelgaard, A.M., & Sandvig, K. (2003) Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol.* **13**, 92–100.

Yeagle, P.L. (ed.). (2004) *The Structure of Biological Membranes*, 2nd edn, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.

Zimmerberg, J. & Kozlov, M.M. (2006) How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 9–19.

Транспортеры

Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R., & Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* **301**, 610–615.

Fujiyoshi, Y., Mitsuoka, K., de Groot, B.L., Philippesen, A., Grubmiiller, H., Agre, P., & Engel, A. (2002) Structure and function of water channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 509–515.

Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., & Karlsh, S.J.D. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 817–849.

Kjellbom, P., Larsson, C., Johansson, I., Karlsson, M., & Johanson, U. (1999) Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* **4**, 308–314.

Обзор промежуточного уровня сложности.

Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 282–295.

Очень хорошо иллюстрированный обзор среднего уровня сложности.

Mueckler, M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* **219**, 713–725.

Schmitt, L. & Tampe, R. (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin. Struct. Biol.* **12**, 754–760.

Stokes, D.L. & Green, N.M. (2003) Structure and function of the calcium pump. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 445–468.

Углубленный обзор.

Sui, H., Han, B.-G., Lee, J.K., Walian, P., & Jap, B.K. (2001) Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* **414**, 872–878.

Расшифровка структуры аквапорина по результатам кристаллографического исследования с высоким разрешением.

Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue. *Nature* **430**, 529–535.

Toyoshima, C., Nomura, H., & Tsuda, T. (2004) Lumenal gating mechanism revealed in calcium pump crystal structures with phosphate analogs. *Nature* **432**, 361–368.

Дополнительные материалы доступны в онлайн версии этой статьи, в них вошла прекрасная видеозапись предполагаемого механизма транспорта.

Watson, R.T. & Pessin, J.E. (2006) Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 215–222.

Обзор среднего уровня сложности о регуляции транспорта глюкозы через GLUT4.

Ионные каналы

Ashcroft, F.M. (2006). From molecule to malady. *Nature* **440**, 440–447.

Краткий обзор множества известных причин возникновения заболеваний человека, обусловленных дефектами ионных каналов.

Doyle, D.A., Cabral, K.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., & MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69–77.

Первая установленная кристаллическая структура ионного канала.

Edelstein, S.J. & Changeux, J.P. (1998) Allosteric transitions of the acetylcholine receptor. *Adv. Prot. Chem.* **51**, 121–184.

Повышенного уровня сложности обсуждение конформационных изменений, индуцируемых ацетилхолином.

Gadsby, D.C., Vergani, P., & Csanady, L. (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**, 477–483.

Один из семи отличных обзоров по теме ионных каналов, которые собраны в данном номере журнала Nature.

Gouaux, E. & MacKinnon, R. (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* **310**, 1461–1465.

Краткий обзор структурных особенностей каналов и насосов, придающих им специфичность к соответствующим ионам.

Guggino, W.B. & Stanton, B.A. (2006) New insights into cystic fibrosis: molecular switches that regulate CFTR. *Nature Rev. Molec. Cell Biol.* **7**, 426–436.

Hille, B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd edn, Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Текст промежуточного уровня сложности, посвященный главным образом работе ионных каналов.

Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R. (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K^+ channel. *Nature* **423**, 33–41.

King, L.S., Kozono, D., & Agre, P. (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 687–698.

Обзор среднего уровня сложности о локализации аквапоринов в тканях млекопитающих и влиянии дефектов в аквапоринах на физиологию.

Lee, A.G. & East, J.M. (2001) What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism. *Biochem J.* **356**, 665–683.

Long, S.B., Campbell, E.B., & MacKinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^+ channel. *Science* **309**, 897–902.

Long, S.B., Campbell, E.B., & MacKinnon, R. (2005) Voltage sensor of $Kv1.2$: structural basis of electromechanical coupling. *Science* **309**, 903–908.

В двух последних статьях описаны исследования структуры K^+ -канала, которые привели к разработке моделей транспорта в K^+ -канале.

Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., & Unwin, N. (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949–955.

Обзор среднего уровня сложности.

Neher, E. & Sakmann, B. (1992) The patch clamp technique. *Sci. Am.* (March) **266**, 44–51.

Описание электрофизиологических методов измерения активности единичного ионного канала. Эти методы были разработаны лауреатами Нобелевской премии.

Sheppard, D.N. & Welsh, M.J. (1999) Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol. Rev.* **79**, S23–S46.

Один из 11 обзоров в этом номере журнала, посвященных хлорному каналу CFTR; описана структура поверхности, активность, регуляция, биосинтез и патофизиология.

Shi, N., Ye, S., Alam, A., Chen, L., & Jiang, Y. (2006) Atomic structure of a Na^+ - and K^+ -conducting channel. *Nature* **440**, 427–429.

Исследование методом PCA ионных каналов, подходящих и для Na^+ , и для K^+ , и объяснение их двойной специфичности через их структуру.

Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y. (2006) How does voltage open an ion channel? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 23–52.

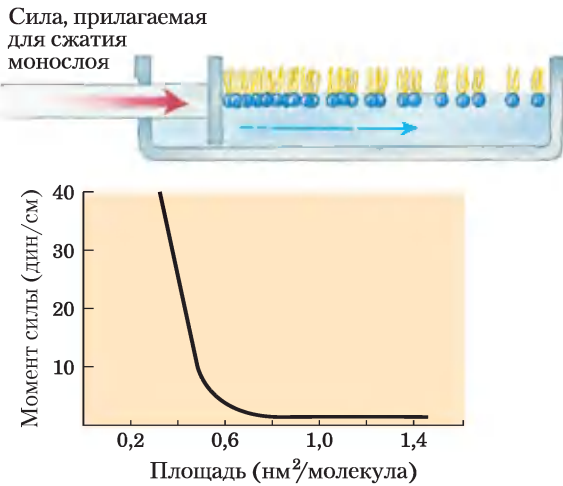
Обзор повышенного уровня сложности о механизмах проведения электрического тока в ионных каналах.

Yellen, G. (2002) The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* **419**, 35–42.

Вопросы и задачи

1. Определение площади поперечного сечения липидной молекулы. Когда фосфолипиды острожно наслаивают на поверхность воды, они ориентируются на поверхности раздела вода–воздух таким образом, что их полярные «головки» обращены в воду, а гидрофобные «хвосты» — в воздух. Был создан прибор (а), который уменьшает площадь поверхности, доступную липидному слою. Измеряя силу (давление), необходимую для того, чтобы приблизить молекулы липидов друг к другу, возможно определить, когда эти молекулы окажутся плотно упакованы в непрерывный монослой. Когда это достигается, сила, требуемая для дальнейшего уменьшения площади поверхности, резко увеличивается (б). Как бы

вы использовали этот прибор для определения средней площади, занимаемой одной липидной молекулой в монослое?



2. Доказательство в пользу существования липидного бислоя. В 1925 г. Э. Гортер и Ф. Грендел использовали прибор, подобный описанному в задаче 1, для того чтобы определить площадь поверхности липидного монослоя, образованного липидами, экстрагированными из эритроцитов животных разных видов. Они использовали микроскоп для измерения размеров отдельных клеток и рассчитали среднюю площадь поверхности одного эритроцита. Они получили данные, представленные в таблице. Были ли эти исследователи правы, сделав вывод, что «хромоциты (эритроциты) покрыты слоем жирных веществ, толщина которого составляет две молекулы» (т. е. липидным бислоем)?

Животные	Объем упакованных клеток (мл)	Число клеток (на мм³)	Общая площадь поверхности липидного монослоя клеток (м²)	Общая площадь поверхности одной клетки (мкм²)
Собака	40	8 000 000	62	98
Овца	10	9 900 000	6,0	29,8
Человек	1	4 740 000	0,92	99,4

Источник: Gorter, E. & Grendel, F. On bimolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. *J. Exp. Med.* **41**, 439–443.

3. Число молекул детергента в мицелле. Когда небольшое количество додецилсульфата на-

трия (SDS; $\text{Na}^+\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3^-$) растворяется в воде, молекулы этого детергента диссоциируют на ионы. При дальнейшем добавлении детергента достигается концентрация (критическая концентрация мицеллообразования), при которой мономерные ионы образуют ассоциаты — мицеллы. Критическая концентрация для SDS составляет 8,2 мМ. Мицеллы имеют среднюю молекулярную массу около 18 000 (сумма молекулярных масс молекул SDS в мицелле). Рассчитайте среднее число молекул в мицелле этого детергента.

4. Свойства липидов и липидного бислоя. Липидный бислой находится между двумя водными фазами и обладает следующим важным свойством: он состоит из двух двумерных поверхностей, края которых находятся так близко друг к другу, что подвергаются самоуплотнению, формируя липосомы. (а) Какие свойства липидов ответственны за это свойство бислоя? Объясните. (б) Каковы последствия этого свойства для структуры биологических мембран?

5. Длина молекулы жирной кислоты. Расстояние углерод–углерод для одинарной связи (как в ацильной цепи насыщенной жирной кислоты) составляет 1,5 Å. Оцените длину одной молекулы пальмитиновой кислоты в ее полностью вытянутой форме. Если две молекулы пальмитиновой кислоты поместить конец к концу, какова будет их общая длина по сравнению с толщиной липидного бислоя в биологической мембране?

6. Температурная зависимость латеральной диффузии. Эксперимент, описанный на рис. 11-17, проводился при 37 °С. Какое влияние на скорость диффузии оказало бы понижение температуры эксперимента до 10 °С?

7. Синтез желудочного сока: энергетика. Желудочный сок (рН 1,5) производится перекачиванием ионов H^+ и Cl^- из плазмы крови (рН 7,4) в желудок. Рассчитайте количество свободной энергии, необходимой для концентрирования H^+ в 1 л желудочного сока при 37 °С. Сколько молекул АТФ нужно гидролизовать для производства такого количества свободной энергии в условиях клетки? Изменение свободной энергии гидролиза АТФ в условиях клетки составляет около –58 кДж/моль (как показано в гл. 13). Влиянием

трансmemбранного электрического потенциала можно пренебречь.

8. Энергетика Na^+/K^+ -АТРазы. Каково изменение свободной энергии переноса 1 моль Na^+ из клетки в кровь при 37°C для типичной клетки позвоночного с трансmemбранным потенциалом $-0,07\text{ В}$ (отрицательный внутри)? Примем концентрацию Na^+ внутри клетки равной 12 мМ , а в плазме крови — 145 мМ .

9. Действие оубаина на ткань почки. Оубаин специфически ингибирует активность Na^+/K^+ -АТРазы животных тканей. Об ингибировании оубаином какого-либо другого фермента неизвестно. Когда оубаин добавляют к тонким срезам живой почечной ткани, он ингибирует поглощение кислорода на 66% . Почему? Что может нам рассказать это наблюдение об использовании энергии дыхания почечной тканью?

10. Энергетика симпорта. Предположим, вы экспериментально определили, что клеточная система транспорта глюкозы, приводимая в действие симпортом Na^+ , может накапливать глюкозу в концентрациях, в 25 раз превышающих таковые во внешней среде, в то время как внешняя $[\text{Na}^+]$ была только в 10 раз больше, чем внутриклеточная $[\text{Na}^+]$. Не нарушает ли это законов термодинамики? Если нет, какое объяснение вы могли бы дать этому наблюдению?

11. Локализация мембранного белка. Относительно неизвестного мембранного белка X сделаны следующие наблюдения. Его можно экстрагировать из разрушенных мембран эритроцитов в концентрированный солевой раствор, он также может расщепляться на фрагменты протеолитическими ферментами. В результате обработки эритроцитов протеолитическими ферментами и последующих разрушения и экстракции мембранных компонентов получается интактный X . Однако обработка тень эритроцитов (которые как раз и состоят из плазматической мембраны, получающейся путем разрушения клеток и отмывания от гемоглобина протеолитическими ферментами с последующими разрушением и экстракцией) дает в значительной степени фрагментированный X . На что указывают эти наблюдения относи-

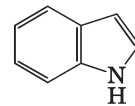
тельно локализации белка X в плазматической мембране? Для интегрального или для периферического белка характерны эти свойства X ?

12. Самовосстановление мембраны. Клеточные мембраны являются самовосстанавливающимися — если их проколоть или механически разрушить, они быстро и самопроизвольно «затягивают раны». Какие свойства мембран отвечают за это важное качество?

13. Температуры плавления липидов. Мембранные липиды в образцах ткани, полученных из разных частей ноги северного оленя, различаются по составу жирных кислот. Мембранные липиды из ткани около копыта имеют более высокое содержание ненасыщенных жирных кислот, чем липиды из ткани в верхней части ноги. Каково значение этого факта?

14. Флип-флоп-диффузия. Внутренний монослой мембраны эритроцитов человека состоит преимущественно из фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина, наружный слой — в основном из фосфатидилхолина и сфингомиелина. Хотя фосфолипидные компоненты мембраны способны диффундировать в жидком бислое, эта асимметрия все время поддерживается. Каким образом?

15. Проницаемость мембраны. При $\text{pH } 7$ триптофан пересекает липидный бислой со скоростью, составляющей примерно тысячную долю скорости транспорта близкородственного триптофану индола:



Предложите объяснение этого наблюдения.

16. Перенос воды аквапоринами. В каждом эритроците человека $\sim 2 \cdot 10^5$ мономеров АQP-1. Если молекулы воды пересекают плазматическую мембрану со скоростью $5 \cdot 10^8$ тетрамеров АQP-1 в секунду, а объем эритроцита составляет $5 \cdot 10^{-11}$ мл, как быстро объем эритроцита уменьшится наполовину при высокой осмолярности (1 М), которую он встречает в тканевой жидкости мозгового слоя почки? Считайте, что эритроцит целиком состоит из воды.

17. Маркировка переносчика лактозы. Бактериальный транспортер лактозы, который высокоспецифичен к своему субстрату лактозе, содержит остаток Cys, необходимый для его транспортной активности. В результате реакции N-этилмалеимида (NEM) с этим остатком Cys переносчик необратимо инактивируется. Высокая концентрация лактозы в среде препятствует такой инактивации, вероятно, благодаря стерической защите остатка Cys, который находится в связывающем лактозу сайте или вблизи него. Другие сведения о белке-транспортере отсутствуют. Предложите эксперимент, который дал бы возможность определить M_r Cys-содержащего полипептида транспортера.

18. Установление топологии мембранного белка по аминокислотной последовательности. Вы клонировали ген предположительно мембранного белка эритроцитов человека. Из нуклеотидной последовательности гена вы знаете аминокислотную последовательность белка. Как только по последовательности оценить возможность того, что этот белок является интегральным? Предположим, белок окажется интегральным белком типа I или II. Предложите биохимические или химические эксперименты, которые позволят определить тип белка.

19. Поглощение лейцина в кишечнике. Вы изучаете поглощение L-лейцина эпителиальными клетками кишечника мыши. Измерения кинетики поглощения L-лейцина и двух его аналогов с Na^+ в буфере и без него дают результаты, представленные в таблице. Какой вывод вы можете сделать о свойствах и механизме действия переносчика лейцина? Ожидаете ли вы, что поглощение L-лейцина будет ингибироваться оуабаином?

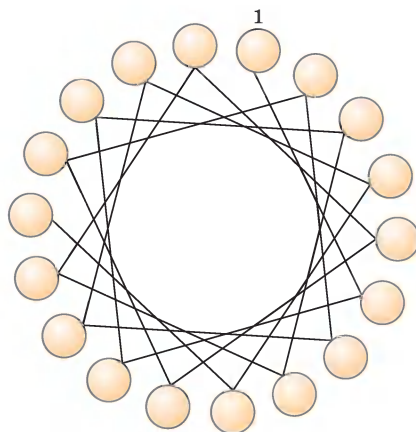
Субстрат	Поглощение в присутствии Na^+		Поглощение в отсутствие Na^+	
	V_{\max}	K_t (мМ)	V_{\max}	K_t (мМ)
L-лейцин	420	0,24	23	0,2
D-лейцин	310	4,7	5	4,7
L-валин	225	0,31	19	0,31

20. Влияние ионофора на активный транспорт. Вернемся к транспортеру лейцина (задача 19). Будут ли изменяться V_{\max} и/или K_t , если вы до-

бавите ионофор Na^+ в исследуемый раствор, содержащий Na^+ ? Объясните.

21. Поверхностная плотность мембранного белка. Клетка *E. coli* может быть индуцирована для производства около 10 000 копий транспортера лактозы ($M_r = 31\,000$) на клетку. Примите, что *E. coli* — цилиндр с диаметром 1 мкм и длиной 2 мкм. Какая часть поверхности плазматической мембраны занята молекулами транспортера лактозы? Объясните, как вы сделали свой вывод.

22. Кольцевая диаграмма спирали. Это двумерное изображение спирали — проекция на плоскость, перпендикулярную центральной оси (см. рис. 11-29, б, а также рис. 4-4, з). Используйте представленную ниже диаграмму для определения локализации аминокислотных остатков в спиральном участке со следующей последовательностью: —Val—Asp—Arg—Val—Phe—Ser—Asn—Val—Cys—Thr—His—Leu—Lys—Thr—Leu—Gln—Asp—Lys—.



Что можно сказать о свойствах поверхностей этой спирали? Как эта спираль должна быть ориентирована в пространственной структуре интегрального мембранного белка?

23. Типы молекул в мембране *E. coli*. Плазматическая мембрана *E. coli* приблизительно на 75% по массе состоит из белка, а на 25% — из фосфолипидов. Сколько молекул мембранных липидов приходится на каждую молекулу мембранного белка? Примите среднюю молекулярную массу белка $M_r = 50\,000$, а среднюю массу фосфолипида $M_r = 750$. Какой дополнительной информацией нужно обладать, чтобы оценить долю поверхности мембраны, покрытой липидами?

Биохимия в Интернете

24. Топология мембранного белка. Рецептор гормона адреналина в клетках животных является интегральным мембранным белком ($M_r = 64\ 000$), в котором, как принято считать, семь пронизывающих мембрану участков.

а) Покажите, что белок такого размера способен пересекать мембрану семь раз.

б) Дана аминокислотная последовательность этого белка. Какие участки белка образуют пронизывающие мембрану спирали?

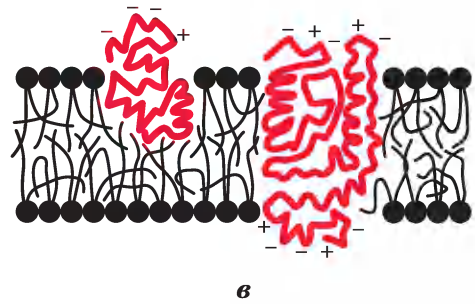
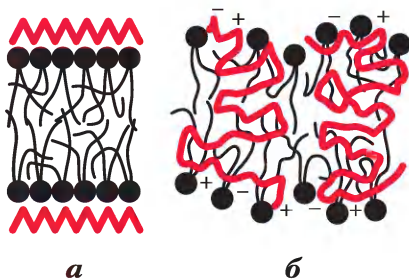
в) Воспользуемся банком данных по белкам (www.rcsb.org). С помощью PDB-идентификатора 1DEP можно найти страницу данных для части β -адренергического рецептора (один из типов рецепторов адреналина) индюка. Используя *Jmol*, предположите, где локализована эта часть рецептора: внутри или на поверхности мембраны. Объясните.

г) Найдите данные для части другого рецептора — ацетилхолинового рецептора нейронов и миоцитов, используя PDB-идентификатор 1A11. Как и для (в), предположите, где локализована эта часть рецептора, и объясните свой ответ.

Если вы еще не пользовались PDB, см. подробную информацию в доп. 4-4 (с. 193).

Анализ экспериментальных данных

25. Жидкостно-мозаичная модель биологической мембраны. На рис. 11-3 представлена общепринятая сегодня жидкостно-мозаичная модель биологической мембраны. Эта модель в деталях была описана в обзорной статье С. Дж. Зингера в 1971 г. Всего в статье были описаны три существовавшие в то время модели мембраны:



А. Модель Девсона–Даниелли–Робертсона. В 1971 г. она была наиболее популярна. В соответствии с этой моделью, фосфолипиды образуют двойной слой. Белки располагаются на обеих поверхностях двойного слоя, прикрепляясь к нему благодаря ионным взаимодействиям между заряженными «головками» фосфолипидов и заряженными группами белков. Важно, что в рамках этой модели внутри двойного слоя белков нет.

Б. Модель Бенсона (модель липопротеиновых субъединиц). В данном случае белки считаются глобулярными, а мембрана представляет собой белково-липидную смесь. Гидрофобные «хвосты» липидов внедряются внутрь гидрофобных участков белков. «Головки» липидов направлены в водную среду. Двойного липидного слоя нет.

В. Мозаичная модель мембраны из липидов и глобулярных белков. Эта модель изображена на рис. 11-3. Липиды образуют двойной слой, внутрь которого встроены белки, причем некоторые выходят за пределы двойного слоя, а некоторые нет. Белки удерживаются в двойном слое гидрофобными взаимодействиями между гидрофобными «хвостами» липидов и гидрофобными участками белков. Изучите приведенные ниже данные и определите, насколько они соответствуют каждой модели мембраны. Какая модель или какие модели подтверждаются, а какие нет? С какими оговорками можно принять представленные данные и их интерпретацию? Объясните свои рассуждения.

а) Когда клетки фиксировали, окрашивали с помощью тетраоксида осмия и анализировали под электронным микроскопом, они выглядели, как «железнодорожные пути» — две темные линии, разделенные светлым промежутком (см. рис. 11-1).

б) Толщина мембран клеток, фиксированных и окрашенных таким образом, 5–9 нм. Толщина

двойного фосфолипидного слоя без вкрапленных белков составляла от 4 до 4,5 нм. Толщина одного монослоя белка ~1 нм.

в) Зингер писал: «В среднем аминокислотный состав мембранных белков неотличим от состава растворимых белков. В частности, значительную долю составляют гидрофобные остатки» (с. 165).

г) Как было описано в задачах 1 и 2 (с. 585–586), исследователи экстрагировали клеточные мембраны, выделяли липиды и сравнивали площадь монослоя липидов с площадью исходной клеточной мембраны. Интерпретация результатов усложнялась обстоятельством, проиллюстрированным на графике в задаче 1: площадь монослоя зависит от того, какое давление на него оказывают. При очень слабом давлении отношение площади монослоя к площади клеточной мембраны составляло 2,0. При более высоком давлении, которое, как считалось, более вероятно в клетке, это отношение было значительно меньше.

д) Исследования методом кругового дихроизма с использованием поляризованного УФ-света позволяют сделать выводы о вторичной структуре белка (см. рис. 4-9). Было показано, что в мембранных белках достаточно много α -спиралей и мало β -слоев. Эти данные соответствуют тому факту, что большинство мембранных белков имеют глобулярную структуру.

е) Фосфолипаза С — фермент, который удаляет полярные головки (включая фосфатные группы) фосфолипидов. В литературе встречаются сообщения о том, что обработка интактных мембран фосфолипазой С приводила к удалению около 70% полярных головок без разрушения «структуры железнодорожных рельсов».

ж) Зингер описал одно исследование, в котором «гликопротеин с молекулярной массой 31 000 в мембранах красных кровяных клеток человека расщепляли трипсином до образования растворимых гликопептидов с молекулярной массой около 10 000, при этом оставшаяся часть гликопротеина была достаточно гидрофобной» (с. 199). Обработка трипсином не вызывала больших изменений в строении мембран, которые оставались целыми. В обзоре Зингера рассматривались и другие работы на эту тему. Однако данные, которые были доступны на 1971 г., не указывали однозначно на справедливость модели В. Эта модель стала общепринятой позднее, когда появились данные новых исследований.

Литература

Singer, S.J. (1971) *The molecular organization of biological membranes. In Structure and Function of Biological Membranes* (Rothfield, L.I., ed.), pp. 145–222, Academic Press, Inc., New York.

Когда около 25 лет тому назад я впервые приступил к изучению гормонов, среди биологов было широко распространено убеждение, что действие гормонов бессмысленно изучать вне организованной клеточной структуры. Однако поразмыслив об истории биохимии, мне показалось вполне реальным, что гормоны могут действовать на молекулярном уровне.

Эрл Уилбур Сазерленд, Нобелевская лекция, 1971

Биосигнализация

- 12.1. Общие свойства систем передачи сигналов 591
- 12.2. Рецепторы, сопряженные с G-белком, и вторичные мессенджеры 596
- 12.3. Рецепторные ферменты 619
- 12.4. Рецепторные гуанилатциклазы, cGMP и протеинкиназа G 627
- 12.5. Мультивалентные адаптерные белки и мембранные рафты 629
- 12.6. Регулируемые ионные каналы 633
- 12.7. Интегрины: двунаправленные рецепторы, ответственные за клеточную адгезию 641
- 12.8. Регуляция транскрипции стероидными гормонами 643
- 12.9. Сигнализация у микроорганизмов и растений 644
- 12.10. Сенсорная передача сигнала в процессах зрения, обоняния и вкуса 650
- 12.11. Регуляция клеточного цикла протеинкиназами 660
- 12.12. Онкогены, гены опухолевых супрессоров и программируемая гибель клетки 666

Способность клеток принимать сигналы из пространства за пределами плазматической мембраны и отвечать на них является основополагающей для жизни. Бактериальные клетки постоянно получают сигналы от мембранных белков, работающих как рецепторы информации об

окружающей среде: pH, осмолярности, наличии пищи, кислорода и света, а также присутствию отвлекающих химических веществ, хищников или конкурентов за пищу. Эти сигналы вызывают соответствующие ответы, такие как движение в направлении пищи, прочь от токсических веществ или образование покоящихся спор в лишенной питания среде. В многоклеточных организмах клетки, выполняющие разные функции, обмениваются огромным множеством сигналов. Клетки растений отвечают на ростовые гормоны и на интенсивность солнечного света. Животные клетки обмениваются информацией о концентрации ионов и глюкозы во внеклеточных жидкостях, при этом в разных тканях протекают взаимозависимые метаболические процессы; в зародыше организуется правильное расположение клеток в процессе развития. Во всех этих случаях сигнал представляет собой *информацию*, которая распознается и принимается специфическими рецепторами и преобразовывается в клеточный ответ, всегда включающий некий химический процесс. Это превращение информации в химические реакции называется **передачей (трансдукцией) сигнала** и является универсальным свойством живых клеток.

12.1. Общие свойства систем передачи сигналов

Передача сигналов происходит в высшей степени специфично и с высокой чувствительностью. Специфичность достигается точной молекулярной комплементарностью между молекулами

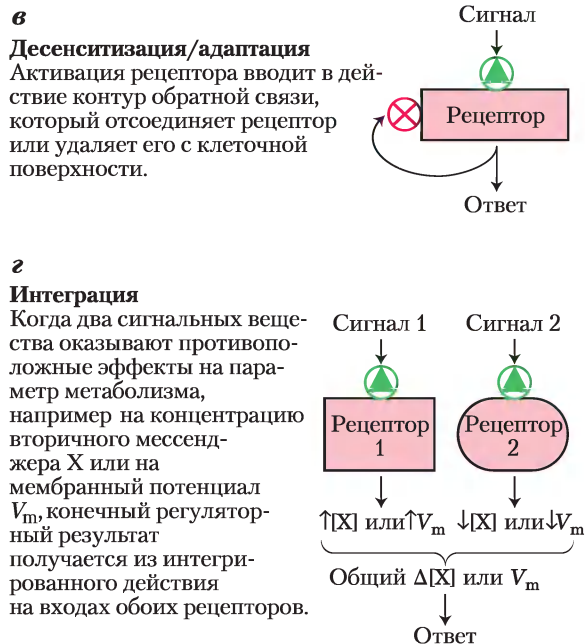
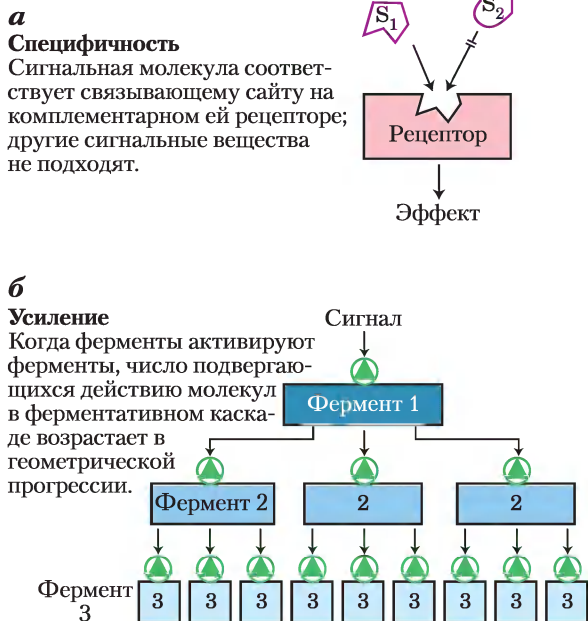


Рис. 12-1. Четыре отличительных свойства систем передачи сигнала.

сигнального вещества и рецептора (рис. 12-1, а), опосредуемой теми же слабыми взаимодействиями (нековалентной природы), которые управляют реакциями фермента с субстратом и ответом антиген–антитело. Многоклеточные организмы имеют дополнительный уровень специфичности, так как рецепторы данного сигнала или внутриклеточные мишени данного сигнального пути присутствуют только в определенных типах клеток. Например, гормон, высвобождающий тиреотропин, запускает ответы в клетках передней доли гипофиза, но не в гепатоцитах (клетках печени), которые не имеют рецепторов для этого гормона. Адреналин изменяет метаболизм гликогена в гепатоцитах, но не в эритроцитах; хотя оба типа клеток имеют рецепторы для этого гормона, но клетки печени содержат гликоген и метаболизирующий его фермент, который стимулируется адреналином, в эритроцитах их нет.

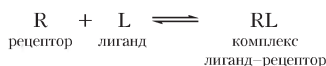
Чрезвычайно высокую чувствительность передатчиков (трансдукторов) сигнала обеспечивают три фактора: высокое сродство рецепторов к сигнальным молекулам, кооперативность (часто, но не всегда) лиганд-рецепторного взаимодействия и усиление сигнала ферментативными каскадами. **Сродство** между сигнальным

веществом (лигандом) и рецептором можно выразить с помощью константы диссоциации K_D , обычно $\leq 10^{-10}$ М или меньше, т. е. рецептор обнаруживает пикомолярные концентрации сигнального вещества. Лиганд-рецепторные взаимодействия оценивают количественно анализом по Скэтчарду — определяют сродство (K_D) и число лиганд-связывающих центров в рецепторе (доп. 12-1).

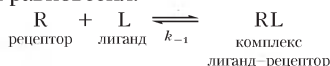
Кооперативность лиганд-рецепторного взаимодействия приводит к сильной активации рецептора при малых изменениях концентрации лиганда (вспомним эффект кооперативности при связывании кислорода гемоглобином; рис. 5-12). **Усиление ферментативными каскадами (амплификация)** происходит, когда фермент, связанный с сигнальным рецептором, активируется и в свою очередь катализирует активацию многих молекул второго фермента, каждая из которых активирует много молекул третьего фермента и т. д. (рис. 12-1, б). Такие каскадные механизмы за миллисекунды обеспечивают увеличение скорости реакции на несколько порядков. Ответ на поступивший сигнал должен в какой-то момент прекращаться, чтобы вызванные реакции соответствовали силе исходного сигнала.

Действие гормона в клетке начинается, когда гормон (лиганд, L) специфически и прочно связывается со своим белковым рецептором (R) внутри или на поверхности клетки-мишени. Связывание возникает благодаря нековалентным взаимодействиям (образование водородных связей, гидрофобное и электростатическое взаимодействия) между комплементарными поверхностями лиганда и рецептора. Взаимодействие рецептор–лиганд приводит к изменению конформации рецептора, влияющему на его биологическую активность. Рецептор может быть ферментом, регулятором фермента, ионным каналом или регулятором экспрессии гена.

Связывание лиганда и рецептора описывается уравнением



Подобно связыванию фермента и субстрата, такое связывание зависит от концентраций взаимодействующих компонентов и может быть охарактеризовано константой равновесия:



$$K_a = \frac{[RL]}{[R][L]} = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = 1/K_d$$

где K_a — константа ассоциации, K_d — константа диссоциации.

Как и связывание фермента с субстратом, связывание лиганд–рецептор является насыщаемым. По мере того как все большее количество лиганда добавляется к фиксированному количеству рецептора, число молекул рецептора, захватываемых лигандом, увеличивается (рис. 1, а). Для грубой оценки лиганд–рецепторного сродства служит концентрация лиганда, необходимая для полунасыщения рецептора. Используя анализ связывания лиганда и рецептора по Скэтчарду, мы можем оценить и константу диссоциации K_d , и число связывающих центров в данном препарате. Когда связывание достигает равновесия, общее число возможных связывающих центров B_{\max} равно сумме числа незанятых центров ($[R]$) и числа занятых лигандом центров ($[RL]$); т. е. $B_{\max} = [R] + [RL]$. Число незанятых центров можно выразить как общее число всех центров минус за-

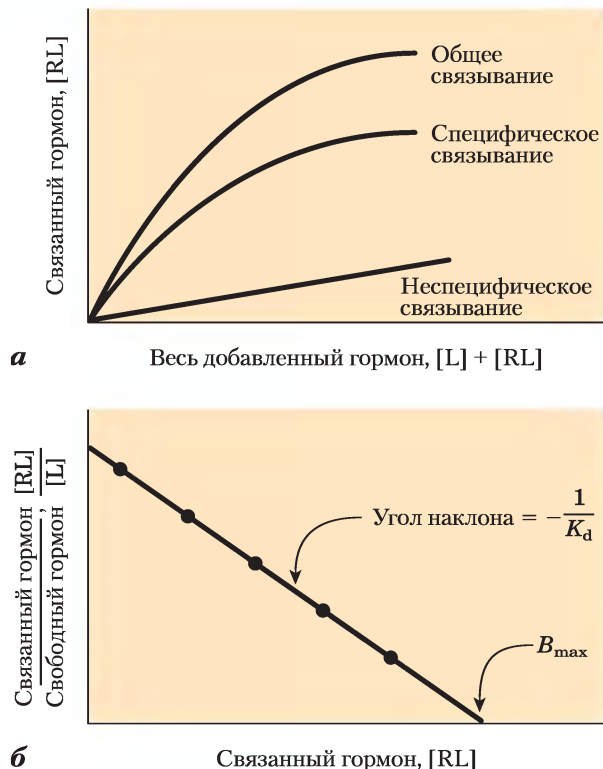


Рис. 1. Анализ взаимодействия лиганда с рецептором по Скэтчарду. Радиоактивно меченный лиганд L, например гормон, в разных концентрациях добавляют к фиксированному количеству рецептора R и определяют содержание гормона после отделения комплекса гормон–рецептор RL от свободного гормона. **а)** График $[RL]$ от $[R] + [RL]$ (от суммы свободного и связанного гормона, т. е. весь добавленный гормон) представляет собой гиперболу, восходящую к $[RL]$ при насыщении рецептора. Чтобы контролировать ненасыщаемые неспецифические участки связывания (например, гормоны–эйкозаноиды неспецифически связываются с липидным бислоем), необходима отдельная серия экспериментов по связыванию. Вместе с разбавленным раствором меченого лиганда добавляют большой избыток немеченого гормона. Немеченые молекулы конкурируют с мечеными при специфическом связывании с насыщаемым сайтом на рецепторе, но не при неспецифическом связывании. Чтобы найти величину специфического связывания, надо вычесть неспецифическое связывание из общего. **б)** Линейный график в координатах $[RL]/[L]$ от $[RL]$ позволяет получить K_d и B_{\max} для комплекса рецептор–гормон. Сравните эти графики с графиками V_0 от $[S]$ и $1/V_0$ от $1/[S]$ для фермент–субстратного комплекса (рис. 6–12, доп. 6–1).

нятые центры: $[R] = B_{\max} - [RL]$. Для реакции ассоциации можно теперь записать

$$K_a = \frac{[RL]}{[L](B_{\max} - [RL])}$$

Сделав преобразования, получаем отношение связанного лиганда к свободному (несвязанному):

$$\begin{aligned} \frac{[\text{Связанный лиганд}]}{[\text{Свободный лиганд}]} &= \frac{[RL]}{[L]} = K_a(B_{\max} - [RL]) \\ &= \frac{1}{K_d}(B_{\max} - [RL]) \end{aligned}$$

Чувствительность рецепторных систем может изменяться. Когда сигнальное вещество действует продолжительно (непрерывно), наступает **десенситизация** (десенсибилизация, потеря чувствительности) рецепторной системы (рис. 12-1, в); когда стимул ослабевает ниже порогового значения — система снова обретает чувствительность. Представьте себе, что случается с системой передачи зрительных сигналов, когда вы входите в яркого солнечного света в темную комнату или выходите из темноты на свет.

Последней отличительной чертой систем передачи сигналов является **интеграция** (рис. 12-1, з), т. е. способность системы получать множественные сигналы и давать единый ответ, в соответствии с нуждами клетки или организма. Различные сигнальные пути «переговариваются» друг с другом на разных уровнях, генерируя множество взаимодействий, которые поддерживают гомеостаз в клетке и организме.

При изучении механизмов передачи сигналов выявлена удивительная особенность — их высокая степень консерватизма в процессе эволюции. Хотя общее число различных биологических сигналов (см. табл. 12-1), по-видимому, составляет несколько тысяч и число возможных типов ответов столь же велико, система передачи всех этих сигналов состоит из десятка основных типов белковых компонентов. В данной главе мы рассмотрим несколько примеров основных механизмов передачи сигнала, и обсудим, каким образом они используются для выполнения

В координатах [связанный лиганд]/([свободный лиганд] — [свободный лиганд]) получим прямую с углом наклона $-K_a(-1/K_d)$, которая отсекает на оси абсцисс отрезок, равный B_{\max} (общее число связывающих сайтов) (рис. 1, б). Когда лиганды представляют собой гормоны, значения K_d находятся в интервале от 10^{-9} до 10^{-11} М, что соответствует очень прочному связыванию.

Анализ по Скэтчарду надежен для самых простых случаев, но, как и в случае графиков Лайнуивера–Бэрка для ферментов, если рецептор представлен аллостерическим белком, наблюдаются отклонения от линейного вида.

специфических биологических функций, таких как передача нервного импульса, ответ на сигналы гормонов и ростовых факторов, зрительное, обонятельное и вкусовое восприятие, а также контроль клеточного цикла. Часто конечным этапом сигнального пути является фосфорилирование нескольких специфических белков в клетках-мишенях, что приводит к изменению активности этих белков и, как следствие, к изменению активности клеток. По ходу обсуждения мы постоянно будем обращать внимание на консервативность фундаментальных механизмов передачи биосигналов и на способы адаптации этих основных механизмов к широкому кругу сигнальных путей.

В этой главе мы рассмотрим молекулярные детали нескольких типичных систем передачи сигналов. Триггеры для разных систем разные, но

Таблица 12-1

Некоторые сигналы, на которые отвечают клетки

Антигены	Механический контакт
Вкусовые добавки (тастанты)	Нейромедиаторы
Гликопротеины клеточной поверхности/ олигосахариды	Пахучие вещества (одоранты)
Гормоны	Питательные вещества (нутриенты)
Компоненты внеклеточного матрикса	Свет
	Сигналы, относящиеся к развитию
	Факторы роста
	Феромоны

главные стадии механизма передачи сигналов общие для всех, а именно: сигнальное вещество реагирует с рецептором; активированный рецептор действует на клеточные механизмы, продуцируя второй сигнал или изменяя активность клеточного белка; метаболическая активность (в широком смысле, включая метаболизм РНК, ДНК и белков) в клетке-мишени подвергается изменениям; и наконец, процесс трансдукции завершается, и клетка возвращается в первоначальное (до стимула) состояние. Чтобы проиллюстрировать эти общие свойства сигнальных систем, мы представим в качестве примеров шесть основных сигнальных механизмов (рис. 12-2).

1. *Рецепторы, сопряженные с G-белком*, которые опосредованно активируют (через GTP-связывающие белки, или G-белки) ферменты, генерирующие внутриклеточные вторичные мессенджеры. Это иллюстрируется на примере β -адренергической рецепторной системы, которая реагирует на адреналин (разд. 12.2).

2. *Рецепторные тирозинкиназы* — рецепторы плазматической мембраны, которые одновременно функционируют как ферменты. Когда один из этих рецепторов активируется его внеклеточным лигандом, он катализирует образование внутриклеточного вторичного мессенджера. Примерами могут служить рецептор инсулина (разд. 12.3) и рецептор эпидермального фактора роста (EGF-R).

3. *Рецепторные гуанилатциклазы* — рецепторы плазматической мембраны с цитоплазматическим ферментативным доменом. Внутриклеточный вторичный мессенджер этих рецепторов — циклический гуанозинмонофосфат (сGMP) — активирует протеинкиназу в цитозоле, которая фосфорилирует клеточные белки и таким образом меняет их активность (разд. 12.4).

4. *Управляемые (регулируемые) ионные каналы* плазматической мембраны, которые открываются и закрываются в ответ на связывание

Рецептор, связанный с G-белком

Внешний лиганд, садящийся на рецептор (R), активирует внутриклеточный GTP-связывающий белок (G), который регулирует фермент (E), генерирующий внутриклеточный вторичный мессенджер (X).

Рецептор тирозинкиназы
Связывание лиганда активирует тирозинкиназу, вызывая автофосфорилирование.

Рецептор гуанилатциклазы
Связывание лиганда с внеклеточным доменом стимулирует образование вторичного мессенджера циклического GMP.

Адгезионный рецептор (интегрин)

Связывает молекулы во внеклеточном матриксе, изменяет конформацию и, как следствие этого, — взаимодействие с цитоскелетом.

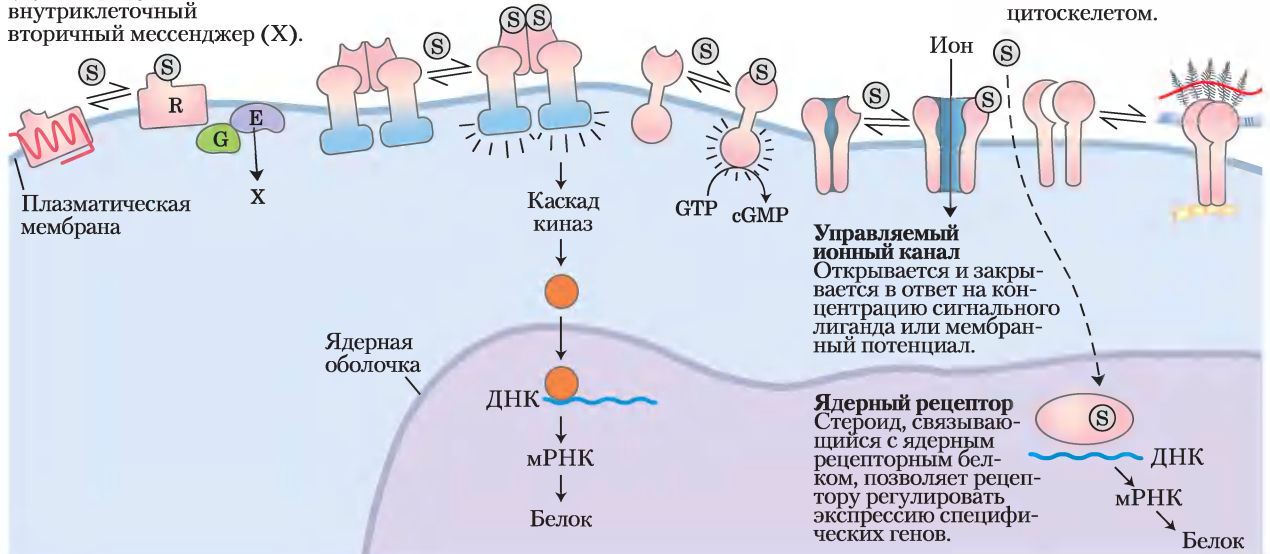


Рис. 12-2. Шесть основных механизмов передачи сигнала.

химических лигандов или изменения трансмембранного потенциала. Эти каналы являются простейшими передатчиками сигнала. Пример такого механизма — ацетилхолиновый ионный канал (разд. 12.2).

5. *Адгезионные рецепторы*, которые взаимодействуют с макромолекулярными компонентами внеклеточного матрикса (например, коллагеном) и передают системе цитоскелета «инструкции», касающиеся миграции клетки или ее сцепления с матриксом. Интегрины (о них говорилось в гл. 10) иллюстрируют этот общий тип механизма передачи сигнала.
6. *Ядерные рецепторы* (стероидные рецепторы), которые при связывании со специфическим лигандом (например, эстрогеном) изменяют скорость, с которой специфические гены транскрибируются и транслируются в клеточные белки. Поскольку стероидные гормоны функционируют по механизму, тесно связанному с регуляцией экспрессии генов, здесь мы рассмотрим их очень кратко (разд. 12.8), а детальное обсуждение их действия отложим до гл. 28.

Мы приступаем к обсуждению механизмов передачи биосигналов и для начала скажем несколько слов о номенклатуре сигнальных белков. В большинстве случаев эти белки были открыты в ходе решения какой-то конкретной задачи и были названы соответствующим образом. Позднее выяснилось, что они участвуют в выполнении гораздо более широкого спектра биологических функций, с которыми их первоначальное название никак не связано. Например, белок ретинобластомы, pRb, исходно был идентифицирован как белок, мутация которого повинна в развитии рака сетчатки (ретинобластомы). Однако теперь известно, что этот белок участвует во многих важных для клеточного деления процессах во всех клетках, а не только в клетках сетчатки. Некоторые гены и белки получили довольно неопределенные названия: например, супрессор опухолевого роста p53 — белок (англ. *protein*) с молекулярной массой 53 кДа, но такое название ничего не говорит о чрезвычайно важной роли этого белка в регуляции деления клеток и развитии рака. По ходу изложения материала мы будем объяснять смысл таких

названий и приводить названия, которые обычно используют исследователи, работающие в данной области. Не смущайтесь, если не сможете понять название белка при первом знакомстве с ним!

Краткое содержание раздела 12.1 ОБЩИЕ СВОЙСТВА СИСТЕМ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ

- Все клетки имеют специфические и высокочувствительные сигналпередающие механизмы, которые сохранились в процессе эволюции.
- Множество разнообразных стимулов действуют через специфические белковые рецепторы в плазматической мембране.
- Рецепторы связывают сигнальную молекулу, усиливают сигнал, интегрируют его с сигналами от других рецепторов и передают в клетку. Если сигнал продолжает действовать, десенситиблизация (десенситизация) рецептора уменьшает или прекращает ответ.
- У многоклеточных организмов существуют шесть основных механизмов сигнализации: 1) мембранные белки, которые действуют через G-белки; 2) рецепторные тирозинкиназы; 3) рецепторные гуанилатциклазы, которые действуют через протеинкиназы; 4) управляемые ионные каналы; ферменты; 5) адгезионные рецепторы, которые переносят информацию между внеклеточным матриксом и цитоскелетом; 6) ядерные белки, которые связывают стероиды и влияют на экспрессию генов.

12.2. Рецепторы, сопряженные с G-белком, и вторичные мессенджеры

Передача сигнала посредством **рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR, от англ. *G-protein-coupled receptors*)**, определяется тремя важными составляющими этой сигнальной системы: рецептор плазматической мембраны с семью спиральными трансмембранными сегментами, фермент в плазматической мембране, который генерирует внутриклеточный **вторичный мессенджер** и **гуа-**

нозиннуклеотидсвязывающий белок (G-белок), активирующий фермент. Стимулированный активированным рецептором G-белок обменивает связанный GDP на GTP; комплекс GTP-белок покидает рецептор и связывается с расположенным поблизости ферментом, изменяя его активность. В геноме человека закодированы около 350 GPCR, распознающих гормоны, ростовые факторы и другие эндогенные лиганды, а также, наверное, 500 GPCR для рецепторов запахов и вкусов. Прототипом сигнальной системы этого вида могут служить β -адренергические рецепторы, которые опосредуют действие адреналина на многие ткани.

GPCR участвуют в развитии многих распространенных заболеваний человека, таких как аллергия, депрессия, слепота, диабет и различные сердечно-сосудистые заболевания. Почти половина *всех* выпускаемых лекарственных препаратов действуют на тот или иной GPCR. Например, бета-блокаторы, назначаемые при столь несхожих заболеваниях, как гипертония, аритмия, глаукома, повышенная нервная возбудимость и мигрень, нацелены на β -адренергический рецептор, который опосредует действие адреналина. Около 150 GPCR, обнаруженных в геноме человека, все еще считаются «сиротскими рецепторами», а это означает, что их лиганды в организме пока не идентифицированы и, следовательно, ничего неизвестно об их биологической функции. β -Адренергический рецептор, биологическая и фармакологическая функции которого хорошо изучены, является прототипом всех GPCR. С него мы и начнем обсуждение систем передачи сигнала. ■

Система β -адренергического рецептора функционирует с участием вторичного мессенджера cAMP

Действие адреналина начинается, когда гормон присоединяется к белковому рецептору в плазматической мембране гормончувствительной клетки. **Адренергические рецепторы** бывают четырех основных типов — α_1 , α_2 , β_1 и β_2 ; они несколько отличаются по сродству и ответам на действие агонистов и антагонистов. **Агонисты** — это структурные аналоги, которые связываются с рецептором и имитируют эффекты его природных лигандов; **антагонисты** — аналоги, которые связываются с рецептором, но не вызы-

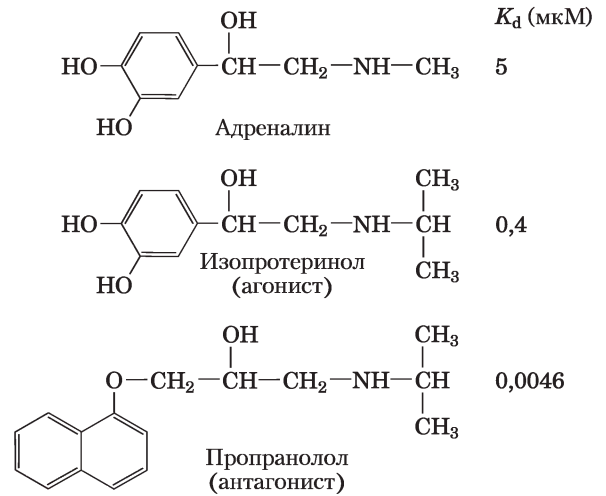


Рис. 12-3. Адреналин и его синтетические аналоги. Адреналин выделяется надпочечниками и регулирует энергетический метаболизм в мышцах, печени и жировой ткани. Он служит также нейромедиатором в адренергических нейронах. Его сродство к рецептору можно оценить константой диссоциации комплекса лиганд-рецептор. Изопротеренол и пропранолол — синтетические аналоги адреналина, один — агонист с большим сродством к рецептору, чем у адреналина, другой — антагонист с очень низким сродством.

вают обычного ответа, а блокируют тем самым эффекты агонистов (рис. 12-3). Четыре типа адренергических рецепторов находятся в разных тканях-мишенях и опосредуют различные ответы на адреналин. В этом разделе мы сфокусируем внимание на **β -адренергических рецепторах** мышц, печени и жировой ткани. Эти рецепторы опосредуют изменения в энергетическом обмене, как описано в гл. 23, в том числе усиливают расщепление гликогена и жиров. Адренергические рецепторы β_1 и β_2 работают по одному и тому же механизму, поэтому мы будем обозначать их как « β -адренергический» в отношении обоих видов.

β -Адренергический рецептор является интегральным белком с семью гидрофобными участками из 20–28 аминокислотных остатков, которые, извиваясь, как змея, пронизывают мембрану семь раз (поэтому такие рецепторы называют еще **серпентиновыми**, или **семиспиральными рецепторами**). Связывание адреналина с участком рецептора глубоко внутри мембраны (рис. 12-4, а, стадия ①) способствует конформационным изменениям во внутриклеточном домене рецептора,

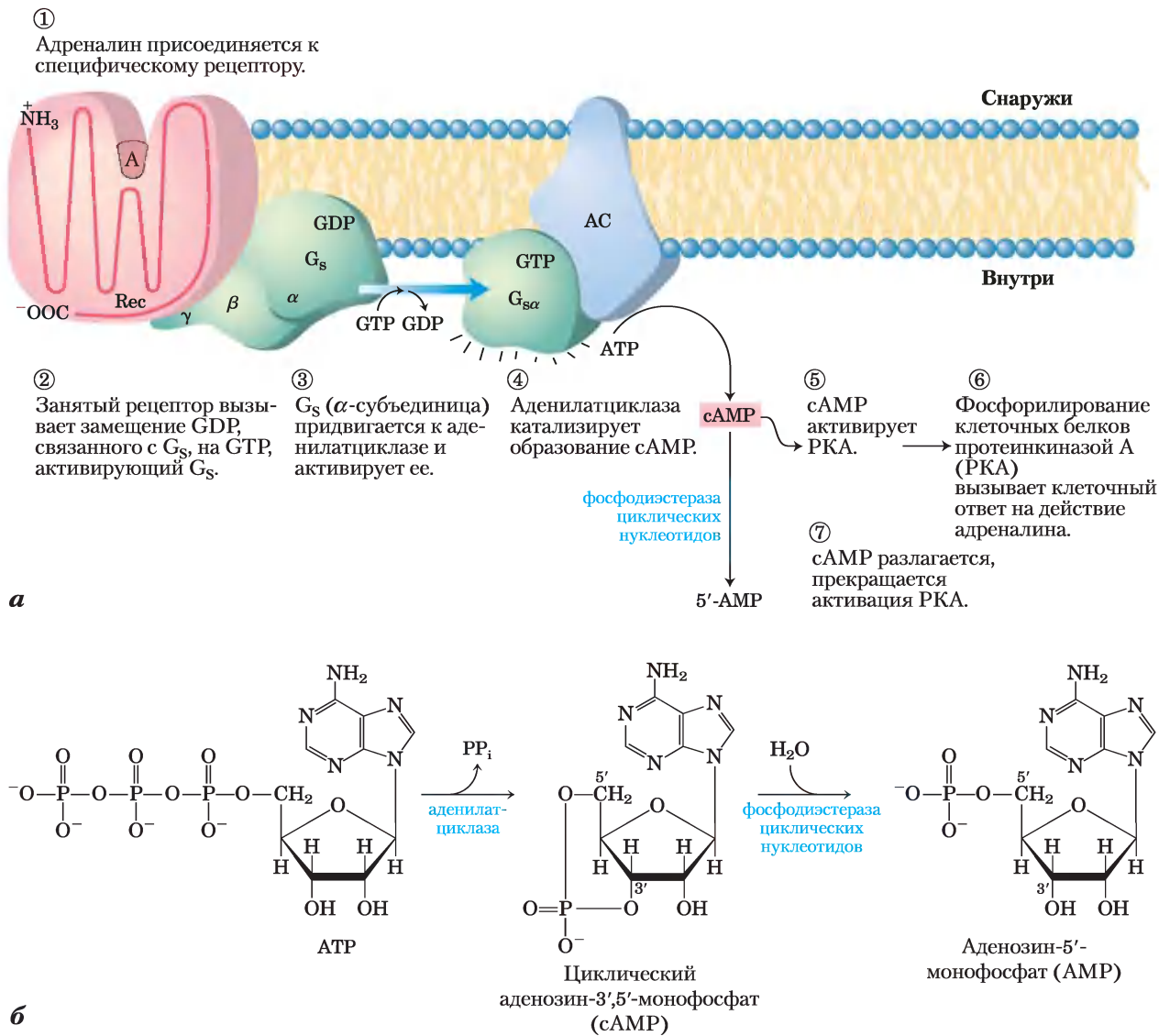


Рис. 12-4. Действие адреналина: β -адренергический путь передачи сигнала. а) Механизм сопряжения связывания адреналина (А) с рецептором (Rec) с активацией аденилатциклазы (AC); в тексте обсуждаются семь стадий этого механизма. Та же молекула аденилатциклазы в плазматической мембране может регулироваться стимулирующим G-белком (G_s), как показано на рисунке, или ингибирующим G-белком (G_i) (не показано). На G_s и G_i действуют разные гормоны. Гормоны, индуцирующие связывание GTP с G_s , вызывают *ингибирование* аденилатциклазы, приводя к понижению внутриклеточной концентрации cAMP. б) Совместное действие ферментов, катализирующих стадии ④ и ⑦, приводит сначала к образованию, а затем к инактивации вторичного мессенджера — cAMP.

что влияет на его взаимодействие со вторым белком сигнального пути — гетеротримерным GTP-связывающим **стимулирующим G-белком**, или G_s , на внутренней стороне плазматической мембраны. Альфред Г. Гилман и Мартин Родбел обна-

ружили, что при связывании GTP с G_s последний стимулирует образование cAMP аденилатциклазой (см. ниже) плазматической мембраны. Белок G_s является прототипом семейства G-белков, участвующих в биосигнализации (см. доп. 12-2);

это гетеротример с субъединицами α , β и γ . Когда GTP занимает нуклеотидсвязывающий сайт, G_s (α -субъединица), G_s поворачивается и может после этого активировать аденилатциклазу (АС на рис. 12-4, а). Когда с этим сайтом связан GDP, G_s не работает. Активированный β -адренергический рецептор взаимодействует с G_s , катализируя замещение GDP на GTP и переводя G_s в активную форму (стадия ②). По мере того как это происходит, β - и γ -субъединицы G_s уходят от α -субъединицы, образуя $\beta\gamma$ -димер, а $G_s\alpha$ со связанным GTP передвигается в плоскости мембраны от рецептора к близлежащей молекуле аденилатциклазы (стадия ③). $G_s\alpha$ удерживается в мембране, ковалентно связываясь с пальмитоильной группой (см. рис. 11-14).

Аденилатциклаза — интегральный белок плазматической мембраны, активный центр этого белка расположен на внутренней стороне клеточной мембраны. Связывание активного $G_s\alpha$ с аденилатциклазой стимулирует циклазу катализировать синтез сАМР (рис. 12-4, а, стадия ④, см. также рис. 12-4, б), увеличивая концентрацию сАМР в цитозоле. Взаимодействие между $G_s\alpha$ и аденилатциклазой становится возможным лишь тогда, когда в белке $G_s\alpha$ в результате конформационных изменений, вызванных связыванием GTP, области «переключателей» оказываются на поверхности.

Это стимулирующее действие $G_s\alpha$ является самолимитируемым; $G_s\alpha$ — это *GTPаза*, которая сама себя выключает, превращая связанный GTP в GDP (рис. 12-5). После этого неактивный $G_s\alpha$ уходит от аденилатциклазы, делая циклазу неактивной. После того как $G_s\alpha$ снова связывается с β - и γ -субъединицами ($G_s\beta\gamma$), G_s опять способен взаимодействовать с рецептором, связанным с гормоном. Множество G-белков играют роль переключателей в системах передачи сигнала с участием GPCR и во многих процессах, в которых происходит слияние или расщепление клеточных мембран (доп. 12-2). 🧠 **Тримерные G-белки: молекулярные выключатели**

Адреналин действует, вызывая увеличение концентрации сАМР вследствие работы аденилатциклазы. Циклический АМР, в свою очередь, в результате аллостерической регуляции активирует **сАМР-зависимую протеинкиназу**, называемую иначе **протеинкиназой А**, или **РКА** (рис. 12-4, а, стадия ⑤), которая катализирует фосфорилирование других белков, включая ки-

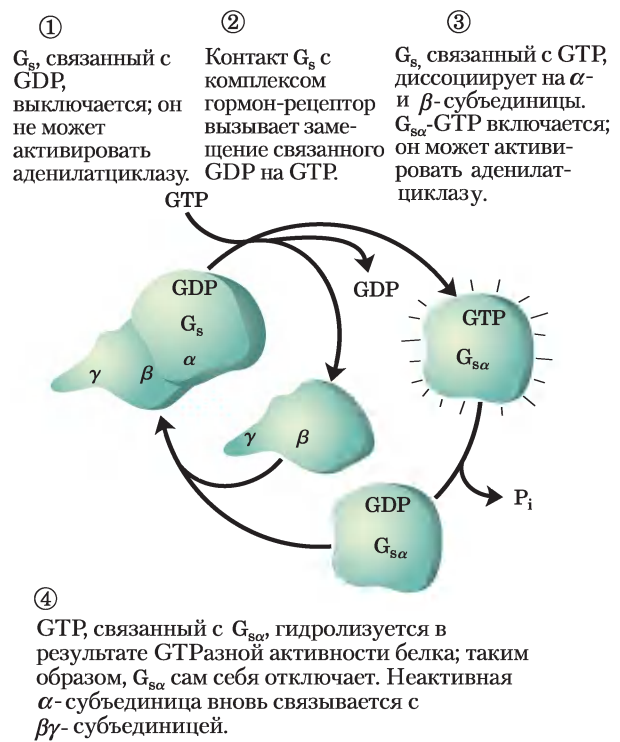


Рис. 12-5. Самоинактивация G_s . Стадии этого процесса описаны в тексте. Присущая белку GTPазная активность, стимулируемая во многих случаях RGS-белками (англ. *regulators of G protein signalling*), определяет, как быстро связанный GTP гидролизуется до GDP и, следовательно, как долго G-белок остается активным.

назу гликогенфосфорилазы *b*. Этот фермент активен в фосфорилированной форме и при необходимости может использовать запасенный гликоген из мышц и печени.

Неактивная форма РКА содержит две каталитические субъединицы (С) и две регуляторные субъединицы (R) (рис. 12-6, а). Тетрамер R_2C_2 каталитически неактивен, поскольку аутоингибирующий домен каждой R-субъединицы занимает субстратсвязывающий центр каждой С-субъединицы. Когда сАМР связывается с двумя центрами на каждой R-субъединице, R-субъединица претерпевает конформационное изменение, и комплекс R_2C_2 диссоциирует, высвобождая две каталитически активные С-субъединицы. Тот же самый механизм, основанный на перемещении аутоингибирующего домена, опосредует аллостерическую активацию многих протеинкиназ их вторичными мессенджерами (как, например, на рис. 12-14 и 12-22).



Альфред Г. Гилман и Мартин Родбел (рис. 1) установили ключевую роль гуанозиннуклеотидсвязывающих белков (G-белков) во многих клеточных процессах, в числе которых восприятие органов чувств, сигналы деления, роста и дифференцировки клеток, внутриклеточное перемещение белков и мембранных везикул, а также синтез белка. В геноме человека закодировано около 200 таких белков, различающихся размерами, субъединичной структурой, внутриклеточной локализацией и функциями. Но все G-белки имеют одну особенность: они обладают способностью активироваться, а затем спустя короткий промежуток времени инактивируют сами себя, исполняя роль молекулярных переключателей со «встроенными часами». К этому суперсемейству белков относятся тримерные G-белки, участвующие в адренергическом пути передачи сигнала (G_s и G_i) и зрительном восприятии (трансдукции); малые G-белки, как те, что опосредуют действие инсулина (Ras), и другие, участвующие в везикулярном транспорте (ARF и Rab), в транспорте в ядро и из ядра (Ran; см. рис. 27-42), а также в регуляции клеточного цикла (Rho); наконец, некоторые белки, задействованные в биосинтезе белка (фактор инициации IF2 и факторы элонгации EF-Tu и EF-G; см. гл. 26). Многие G-белки ковалентно связаны с липидами, которые сообщают этим белкам сродство к мембранам и определяют их внутриклеточную локализацию.

Все G-белки имеют одинаковую общую структуру и используют один и тот же механизм пере-



Рис. 1. Альфред Г. Гилман (слева) и Мартин Родбел (1925–1998; справа). С их лекциями об открытии и изучении G-белков, прочитанными на церемонии вручения Нобелевской премии, можно познакомиться на сайте www.nobelprize.org.

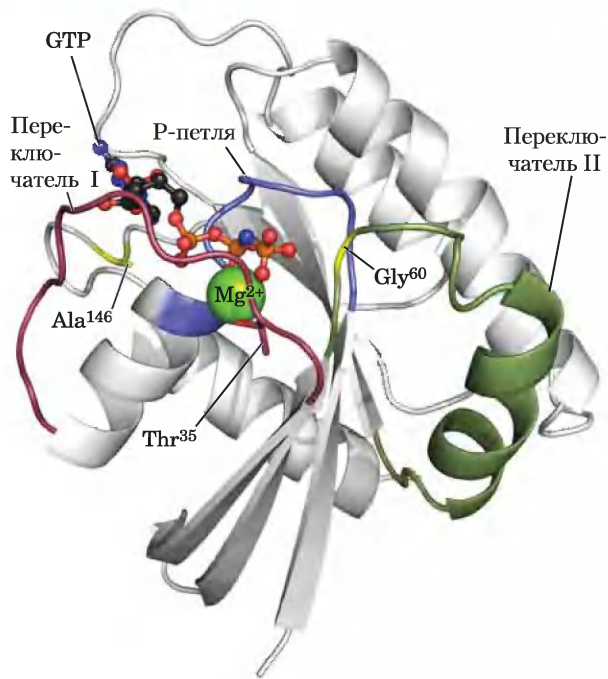


Рис. 2. Белок Ras — прототип всех G-белков (PDB ID 5P21). Mg^{2+} -GTP (шаростержневая модель) удерживается ключевыми остатками фосфатсвязывающей P-петли (синяя), а также остатком Thr³⁵ в области переключателя I (красный) и остатком Gly⁶⁰ в области переключателя II (зеленый). Остаток Ala¹⁴⁶ обеспечивает специфичность связывания GTP, но не ATP.

ключения между неактивной конформацией, образующейся при связывании GDP, и активной конформацией, возникающей при связывании GTP. Как прототип белков данного суперсемейства можно рассматривать небольшой сигнальный белок Ras ($M_r \approx 20$ кДа; рис. 2).

При связывании GTP G-белок переходит в такую конформацию, где некоторые ранее скрытые участки (**переключатель I** и **переключатель II**) оказываются доступными для взаимодействия с белками, находящимися далее на пути передачи сигнала; это продолжается до тех пор, пока G-белок не инактивирует сам себя путем гидролиза связанного GTP до GDP. Конформацию G-белка определяет фосфатная группа в GTP, которая взаимодействует с так называемой P-петлей (англ. *phosphate-binding*; рис. 3). Фосфатная группа в GTP связана с остатком

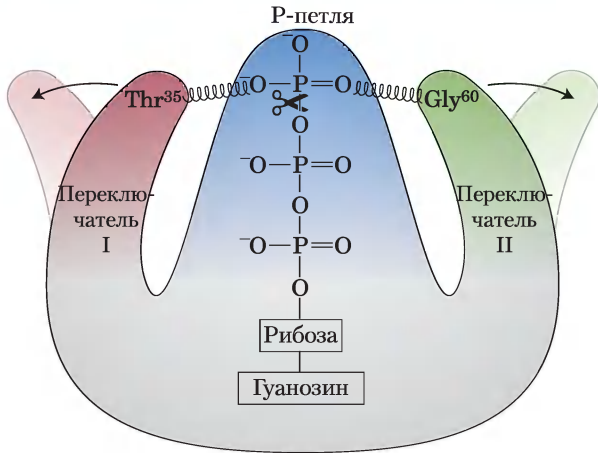


Рис. 3. Гидролиз связанного GTP под действием GTPазной активности Ras и активаторного белка GAP приводит к разрушению водородных связей с остатками Thr³⁵ и Gly⁶⁰, в результате чего белок переходит в такую конформацию, в которой обе области переключателей I и II оказываются недоступными для взаимодействия с другими белками, например с Raf.

Lys P-петли, кроме того, атомы кислорода этой фосфатной группы образуют водородные связи с двумя другими важными остатками — остатком Thr³⁵ в переключателе I и остатком Gly⁶⁰ в переключателе II. Эти водородные связи, как пара пружин, удерживают белок в активной конформации. При расщеплении GTP до GDP с высвобождением P_i водородные связи разрываются, а белок переходит в неактивную конформацию, скрывая те участки, которые в активной конформации взаимодействовали с другими молекулами. Между остатком Ala¹⁴⁶ и кислородом гуанина образуется водородная связь, что способствует связыванию именно GTP, а не ATP.

Собственная GTPазная активность G-белков усиливается примерно в 10⁵ раз под действием **активаторных белков GAP** (англ. *GTPase activator proteins*), которые в случае гетеротримерных G-белков называют **RGS** (англ. *regulators of G-protein signaling*; рис. 4). Таким образом, белки GAP (и RGS) определяют продолжительность «включенного» состояния. Остаток Arg этих белков проникает в активный центр GTPазы G-белка и участвует в катализе. Для ускорения процесса замены связанного GDP на GTP, приводящего к

переходу белка в активную конформацию, требуется участие связанных с G-белком **факторов обмена гуаниновых нуклеотидов GEF** (англ. *guanine nucleotide exchange factors*) (рис. 4).

Поскольку G-белки играют ключевую роль во множестве путей передачи сигнала, неудивительно, что дефекты этих белков приводят к развитию различных заболеваний. Примерно в 25% всех злокачественных опухолей (иногда пропорция еще больше) имеет место мутация белка Ras (обычно она затрагивает один из ключевых остатков в области участка связывания GTP или в P-петле), при которой GTPазная актив-

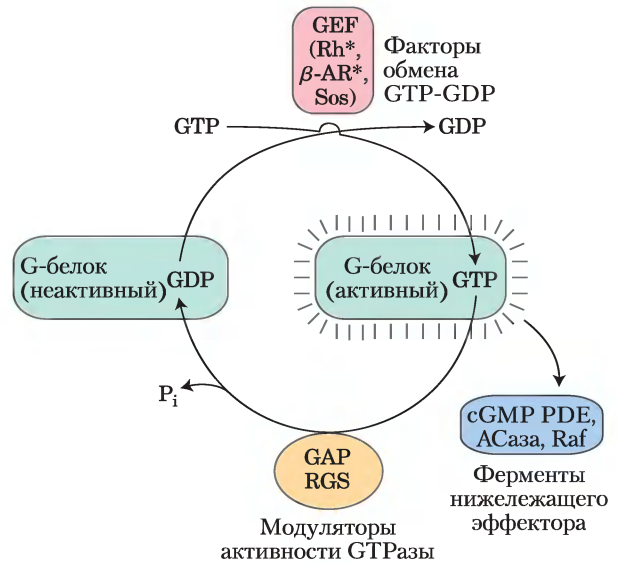


Рис. 4. Факторы, регулирующие активность G-белков (изображены зеленым цветом). Неактивные G-белки (как маленькие, такие как Ras, так и гетеротримерные G-белки, такие как G_s) взаимодействуют с факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF; на красной плашке; часто они представляют собой активируемые рецепторы, такие как родопсиновый и β-адренергический рецепторы, и Sos) и активируются при связывании GTP. Активированные G-белки далее активируют следующие в пути передачи сигнала эффекторные ферменты (на синей плашке; сюда относятся такие ферменты, как cGMP-фосфодиэстераза, аденилатциклаза и Raf). Активаторные белки (GAP в случае небольших G-белков) и регуляторы передачи сигнала с участием G-белков (GAP и RGS, на желтой плашке) модулируют GTPазную активность G-белков, определяя длительность их нахождения в активном состоянии.



ность белка. Белок Ras, активированный в результате связывания GTP, продолжает постоянно находиться в активной конформации, стимулируя деление клеток, которым делиться не следует. Ген опухолевого супрессора *NF1* кодирует белок GAP, усиливающий GTPазную активность нормального белка Ras. Мутации в области *NF1*, приводящие к образованию нефункционального GAP, лишают Ras внешней помощи и оставляют со своей собственной GTPазной активностью. Таким образом, активированный в результате связывания GTP белок Ras остается активным и продолжает посылать клеткам сигнал к делению.

Дефект гетеромерного G-белка также может вести к развитию заболевания. Мутации гена, кодирующего субъединицу G_s (ответственную за изменение концентрации cAMP в ответ на гормональный стимул), могут привести к образованию $G\alpha$, находящейся в постоянно активном или постоянно неактивном состоянии. «Активирующие» мутации обычно затрагивают важные для GTPазной активности остатки и вызывают постоянное повышение концентрации cAMP с серьезными последствиями, включая нежелательную пролиферацию клеток. Например, такие мутации обнаруживаются в 40% случаев аденомы гипофиза. У людей с «инактивирующими» мутациями $G\alpha$ не происходит реакции на гормональные сигналы (например, на сигналы гормона щитовидной железы), передаваемые при участии cAMP. Мутации гена субъединицы трансдукции $T\alpha$, участвующей в передаче зрительных сигналов, ведут к нарушению ночного зрения (куриной слепоте), вероятно, в результате нарушения взаимодействия между активированной субъединицей $T\alpha$ и фосфодиэстеразой внешнего сегмента палочек сетчатки (см. рис. 12-38). Вариации последовательности гена, кодирующего β -субъединицу гетеротримерного G-белка, часто обнаруживают у людей с повышенным кровяным давлением; возможно также, что именно этот ген участвует в развитии ожирения и атеросклероза.

Строение субстратсвязывающего кармана в молекуле PKA аналогично таким же участкам во всех других известных протеинкиназах (рис. 12-6, б). Некоторые остатки в этом кармане встречаются и в тысяче других молекул протеинкиназ.

Патогенные бактерии, вызывающие холеру и коклюш, продуцируют токсины, действующие на G-белки и мешающие нормальной передаче сигнала в клетке. **Холерный токсин**, секретируемый *Vibrio cholerae* в кишечнике зараженного человека, представляет собой гомодимерный белок. Субъединица В связывается со специфическими ганглиозидами на поверхности эпителиальных клеток кишечника, обеспечивая вход в клетку субъединицы А. После вхождения в клетку субъединица А распадается на две части — фрагменты А1 и А2. Далее А1 связывается с фактором рибозилирования ADP (ARF6; это небольшой G-белок клетки-хозяина) через аминокислотные остатки в области переключателей I и II, которые доступны только в том случае, если ARF6 находится в активной форме, т. е. связаны с GTP. Связывание с ARF6 активирует фрагмент А1, который катализирует перенос ADP-рибозы от NAD^+ на остаток Arg в Р-петле субъединицы G_s (рис. 5). ADP-рибозилирование блокирует GTPазную активность G_s , делая этот белок постоянно активным. Это приводит к постоянной активации аденилатциклазы эпителиальных клеток кишечника, повышает концентрацию cAMP и активирует PKA. Протеинкиназа А фосфорилирует хлорный канал CFTR (см. доп. 11-3) и Na^+/H^+ -обменник в эпителиальных клетках кишечника. Происходящий в результате этих событий отток NaCl вызывает массивный выход воды через кишечник, поскольку клетки стремятся предотвратить надвигающееся нарушение осмотического давления. Поэтому главная опасность холеры в потере организмом воды и электролитов. При отсутствии усиленной регидратационной терапии подобное состояние может закончиться летальным исходом.

Коклюшный токсин, выделяемый бактерией *Bordetella pertussis*, катализирует ADP-рибозилирование субъединицы G_i , предотвращая тем самым обмен GDP на GTP и блокируя ингибирование аденилат-

Как показано на рис. 12-4, а (стадия ©), PKA регулирует несколько ферментов, участвующих в сигнальных путях (табл. 12-2). Хотя белки, регулируемые посредством cAMP-зависимого фосфорилирования, выполняют различные функции, все они имеют сходную аминокислотную

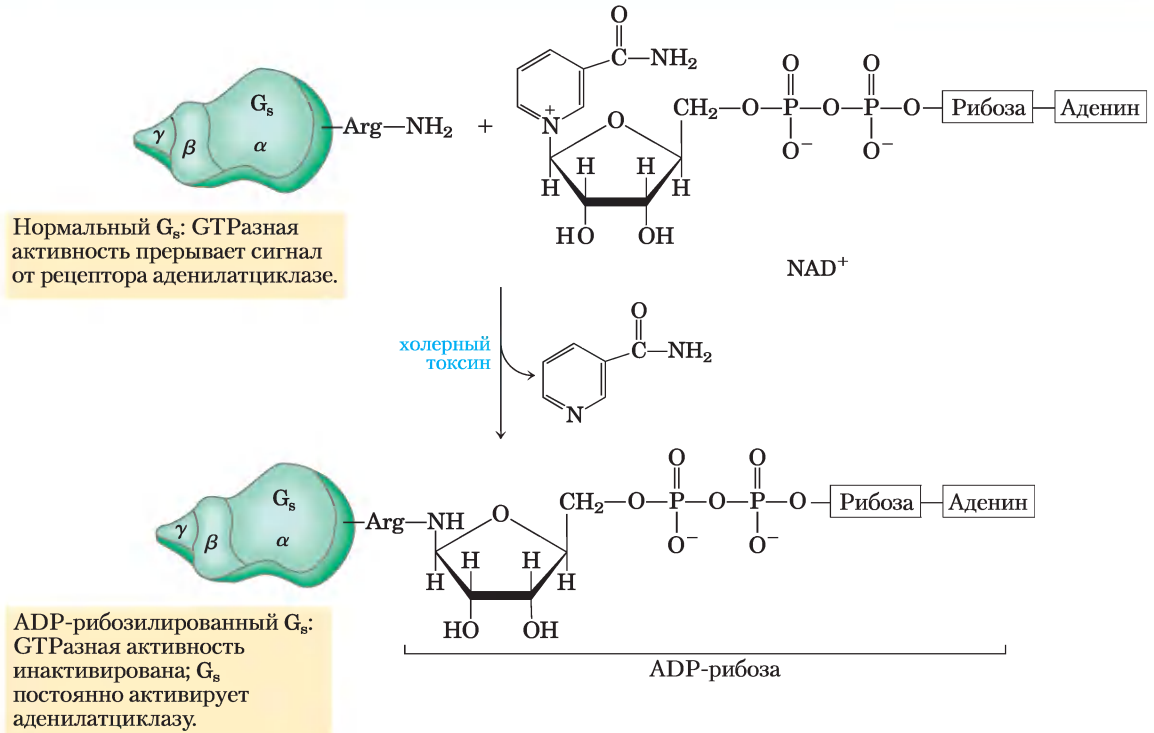


Рис. 5. Бактериальные токсины, вызывающие холеру и коклюш, — это ферменты, катализирующие перенос ADP-рибозной группы с NAD^+ на аргинин в G_s (при холере; показано на рисунке) или на цистеин в G_i (при коклюше). Модифицированные таким образом G-белки не способны воспринимать нормальный гормональный сигнал. Причиной обоих заболеваний является дефект регуляции аденилатциклазы и образование избытка cAMP.

циклазы под действием G_i . Бактерия поселяется в дыхательных путях, где разрушает клетки мерцательного эпителия, которые в норме должны уничтожать слизь. Необходимость очистки дыхательных путей при отсутствии соответствующей активности эпителия приводит к сильнейшему кашлю; этот кашель с удушьем и есть основной симптом заболевания, кроме того, при кашле бактерии попадают в воздух и в организмы других людей. Каким образом дефект сиг-

нального пути с участием G-белка приводит к уничтожению мерцательного эпителия, до сих пор окончательно не установлено.

Принимая во внимание большое число сопряженных с G-белком рецепторов в геноме человека, можно прогнозировать с уверенностью, что в новых исследованиях будут получены дополнительные примеры того, как дефекты сигнальных путей с участием G-белков влияют на здоровье человека.

последовательность вблизи остатков Ser или Thr, подвергающихся фосфорилированию. Именно эта область обуславливает регуляцию таких белков протеинкиназой A. Субстратсвязывающий карман PKA узнает эти последовательности и фосфорилирует остаток Ser или Thr. В результате

сравнения последовательностей различных белковых субстратов PKA была выявлена **консенсусная последовательность** — специфические соседние остатки, необходимые, чтобы «пометить» остаток Ser или Thr как мишень для фосфорилирования (см. табл. 12-2).

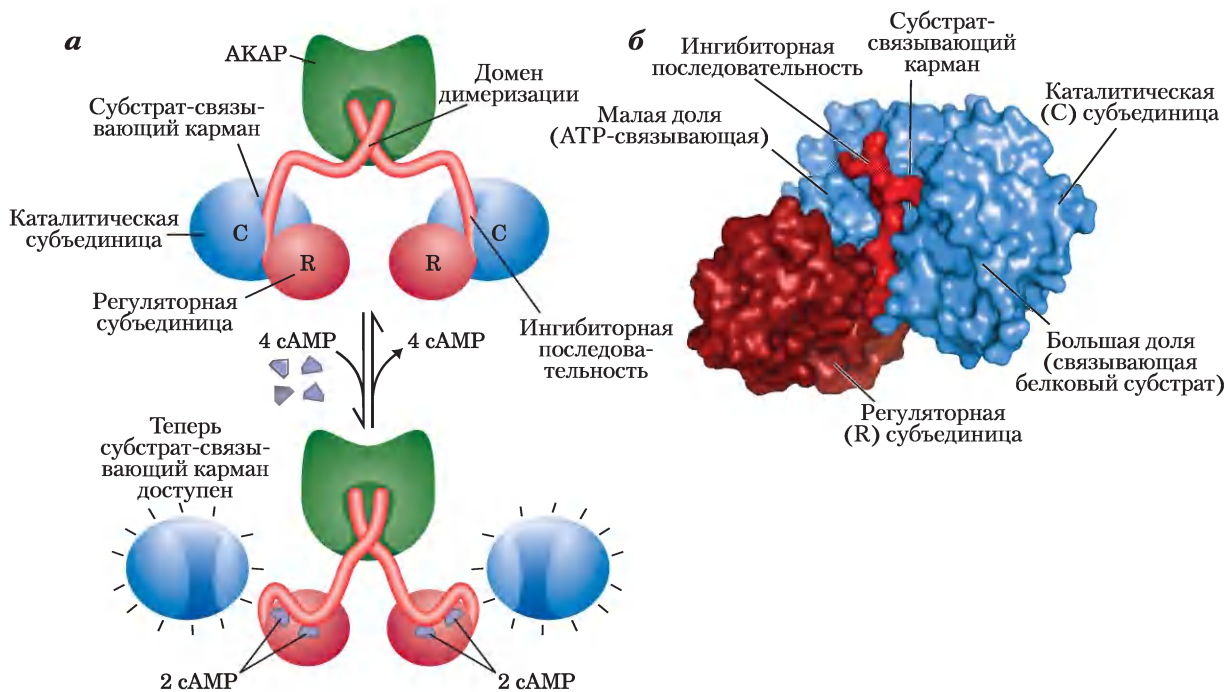


Рис. 12-6. Активация сАМР-зависимой протеинкиназы (РКА). *а*) При низкой концентрации сАМР две идентичные регуляторные субъединицы (R, изображены красным цветом) связаны с двумя идентичными каталитическими субъединицами (C; синие). В комплексе R_2C_2 ингибиторные последовательности R-субъединиц размещаются в субстратсвязывающем кармане C-субъединиц, что предотвращает связывание субстратов; таким образом, данный комплекс не проявляет каталитической активности. N-Концевые последовательности R-субъединиц взаимодействуют между собой и образуют димер R_2 , с которым связывается описанный далее белок АКАР (англ. *A kinase anchoring protein*; зеленый). Когда в ответ на гормональный сигнал концентрация сАМР начинает расти, каждая R-субъединица связывает по две молекулы сАМР и претерпевает значительную перегруппировку, в результате которой ингибиторные последовательности выталкиваются из субстратсвязывающих карманов C-субъединиц, а сами эти субъединицы оказываются в активной форме. *б*) Кристаллическая структура части комплекса R_2C_2 (PDB ID 1U7E) — изображена одна C-субъединица (синяя) и часть R-субъединицы (оттенки красного). Для простоты N-концевые последовательности R-субъединиц, образующие димер, не изображены. Малая доля C-субъединицы содержит участок связывания АТР, а большая доля образует и окружает карман, в котором происходит связывание и фосфорилирование (по остаткам Ser или Thr) белкового субстрата. В неактивной форме ингибиторная последовательность R-субъединицы (ярко-красная) блокирует участок связывания субстрата на C-субъединице.

Передача сигнала посредством аденилатциклазы включает несколько стадий, которые *усиливают* гормональный сигнал (рис. 12-7). Связывание одной молекулы гормона с одним рецептором каталитически активирует несколько молекул G_s . Затем, активируя молекулу аденилатциклазы, каждая активная молекула $G_s\alpha$ стимулирует каталитический синтез множества молекул сАМР. Далее вторичный мессенджер сАМР активирует РКА, каждая молекула кото-

рой в свою очередь катализирует фосфорилирование *многих* молекул белка-мишени — киназы фосфорилазы *b* (рис. 12-7). Эта киназа активирует фосфорилазу *b*, которая обеспечивает быструю мобилизацию глюкозы из гликогена. Суммарный эффект этого каскада — усиление гормонального сигнала на несколько порядков, которое объясняет, почему для гормональной активности требуется чрезвычайно низкая концентрация адреналина (или любого другого гормона).

Таблица 12-2

Некоторые ферменты и другие белки, регулируемые сАМР-зависимым фосфорилированием (протеинкиназой А, РКА)

Фермент/белок	Фосфорилируемая последовательность*	Регулируемый метаболический путь/процесс
Гликогенсинтаза	RASCTSSS	Синтез гликогена
Киназа фосфоорилазы <i>b</i>		
α -субъединица	VEFRRLSI	Распад гликогена
β -субъединица	RTKRSGSV	
Пируваткиназа (печени крысы)	GVLRRASVAZL	Гликолиз
Комплекс пируватдегидрогеназы (тип L)	GYLRRASV	Синтез пирувата для ацетил-СоА
Гормончувствительная липаза	PMRRSV	Мобилизация триацилглицерина и окисление жирных кислот
Фосфофруктокиназа-2/фруктозо-2,6-бисфосфатаза	LQRRRGSSIPQ	Гликолиз/глюконеогенез
Тирозингидроксилаза	FIGRRQSL	Синтез L-ДОФА, дофамина, норадреналина и адреналина
Гистон H1	AKRKASGPPVS	Конденсация ДНК
Гистон H2B	KKAKASRKESYSVYVYK	Конденсация ДНК
Сердечный фосфоламбан (регулятор сердечного насоса)	AIRRAST	Регуляция концентрации внутриклеточного Ca ²⁺
Ингибитор-1 протеинфосфатазы-1	IRRRRPTP	Дефосфорилирование белков
Консенсусная последовательность РКА**	xR[RK]x[ST]B	Многие процессы

* Фосфорилируемый остаток S или T выделен красным. Для обозначения аминокислот использован однобуквенный код (см. табл. 3-1).

**x — любая аминокислота; B — любая гидрофобная аминокислота.

Существует несколько механизмов завершения β -адренергического ответа

Нормально действующая система передачи сигнала должна *выключаться*, после того как заканчивается действие гормонального или другого стимула, поэтому механизмы выключения сигнала есть у всех сигнальных систем. Большинство сигнальных систем, кроме того, способны адаптироваться к продолжительному действию сигнала и становятся менее чувствительными к нему (происходит десенсбилизация). β -Адренергическая система передачи сигнала обладает этими двумя способностями. При падении концентрации адреналина в крови ниже K_d для его рецептора, гормон диссоциирует из комплекса с рецептором, и рецептор принимает неактивную конформацию, в которой он более не способен активировать G_s . Второй способ остановить реакцию на адренергический стимул — это гидролиз GTP, связанного с субъединицей $G\alpha$, катализируемый собственной

GTPазной активностью G-белка. Превращение связанного GTP в GDP благоприятствует возвращению $G\alpha$ в такую конформацию, в которой она связывается с субъединицами $G\beta\gamma$, а G-белок не может взаимодействовать с аденилатциклазой или стимулировать ее. Это приводит к завершению синтеза сАМР. Скорость инактивации G_s зависит от GTPазной активности, которая у субъединицы $G\alpha$ очень низкая. Однако активаторные белки GAP в значительной степени повышают эту GTPазную активность, приводя к ускорению инактивации G-белка (см. доп. 12-2). Белки GAP в свою очередь регулируются другими факторами, что обеспечивает достаточно высокую чувствительность ответа на адренергический стимул. Третий механизм прекращения ответа состоит в удалении вторичного мессенджера, т. е. в гидролизе сАМР до 5'-АМР (который не может выполнять функции вторичного мессенджера) под действием **фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов** (рис. 12-4, а, стадия ©; 12-4, б).

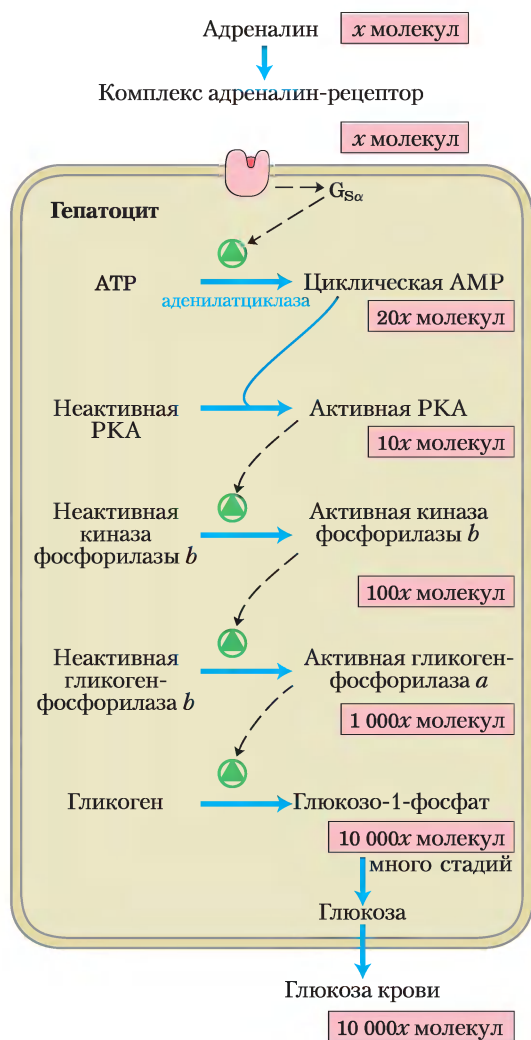


Рис. 12-7. Каскад адреналина. Адреналин запускает серию реакций в гепатоцитах, при которых одни катализаторы активируют другие катализаторы, приводя к многократному усилению сигнала. Связывание небольшого числа молекул адреналина со специфическими β -адренергическими рецепторами на поверхности клетки активирует аденилатциклазу. Количество участвующих молекул приведено, только чтобы проиллюстрировать усиление, вероятно, эти данные сильно занижены. (Две молекулы сАМР активируют одну каталитическую субъединицу РКА, поэтому на этой стадии сигнал не усиливается.)

Наконец, в конце сигнального пути метаболическое действие, вызванное фосфорилированием ферментов, аннулируется фосфопротеинфосфатазами, которые гидролизуют фосфорилированные остатки Ser, Thr или Tyr,

высвобождая неорганический фосфат (P_i). В геноме человека обнаружено около 150 генов фосфопротеинфосфатаз, что меньше числа генов протеинкиназ (500). Известно, что некоторые из этих фосфатаз регулируются, а другие могут действовать конститутивно. Когда концентрация сАМР падает, а РКА возвращается в неактивное состояние (стадия ⑦ на рис. 12-4, а), баланс между фосфорилированием и дефосфорилированием сдвигается под действием этих фосфатаз в сторону продуктов дефосфорилирования.

Десенсibilизация β -адренергического рецептора происходит в результате фосфорилирования или связывания с аррестином

Описанные выше механизмы завершения сигнала работают в тех случаях, когда стимул прекращается. Механизм десенсibilизации позволяет ослабить ответ даже тогда, когда стимул продолжает действовать. Десенсibilизация β -адренергического рецептора опосредуется протеинкиназой, которая фосфорилирует рецептор во внутриклеточном домене, обычно взаимодействующем с G_s (рис. 12-8). Когда рецептор связан с адреналином, **киназа β -адренергического рецептора (β ARK, она же GRK2, см. ниже)** фосфорилирует остатки Ser вблизи С-конца рецептора. Локализованная обычно в цитозоле, β ARK притягивается к плазматической мембране, связываясь с $G_s\gamma$ -субъединицами, и таким образом занимает удобную позицию для фосфорилирования рецептора. Фосфорилирование создает центр связывания для белка **β -аррестина (β arr)**, называемого также аррестин 2, а связывание β -аррестина эффективно препятствует взаимодействию между рецептором и G-белком. Связывание β -аррестина также облегчает секвестрацию рецепторов — удаление рецепторов с плазматической мембраны путем эндоцитоза в малые внутриклеточные везикулы. Рецепторы в этих везикулах дефосфорилируются, затем возвращаются в плазматическую мембрану — цикл завершается, и система вновь приобретает чувствительность к адреналину. Киназа β -адренергического рецептора входит в семейство **рецепторных киназ GRK, сопряженных с G-белком**, все они фосфорилируют серпентиновые рецепторы в их

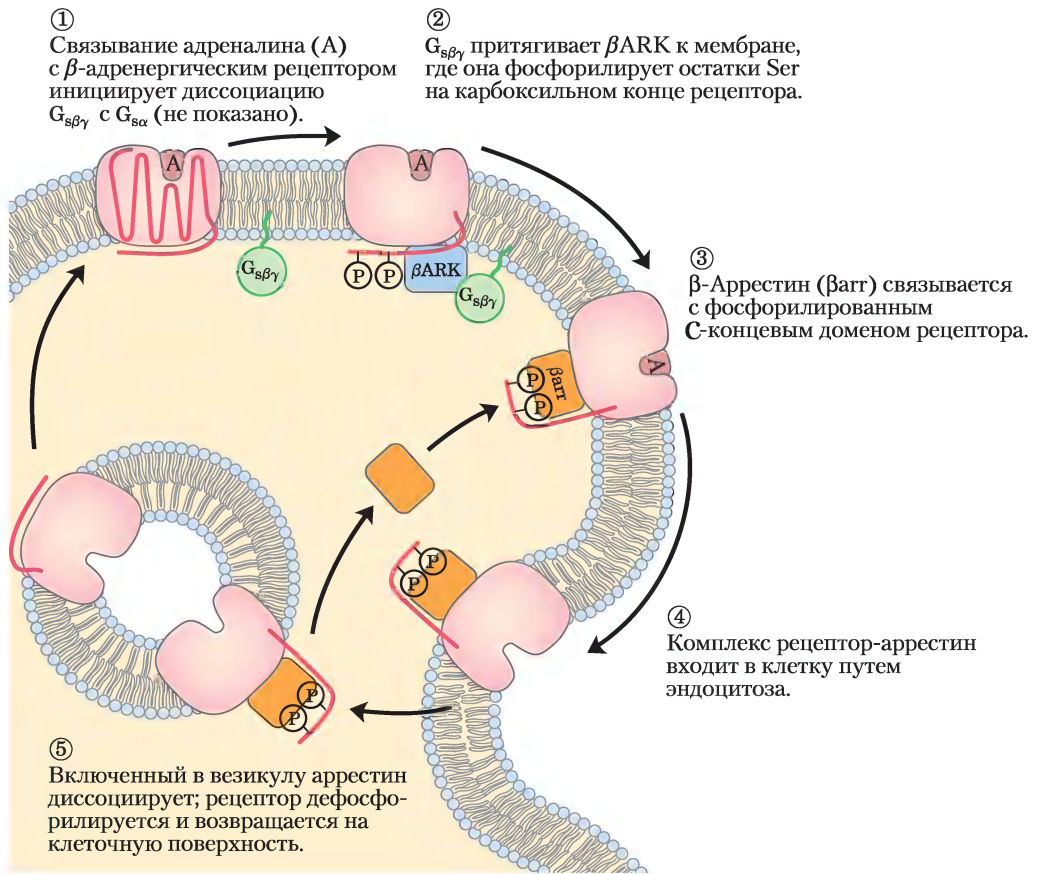


Рис. 12-8. Десенситизация β -адренергического рецептора при непрерывном действии адреналина. Этот процесс опосредуется двумя белками: β -адренергической протеинкиназой (β ARK) и β -аррестином (β arr, аррестин 2).

С-концевых цитозольных доменах и участвуют, подобно β ARK, в де- и ресенситизации рецепторов. В геноме человека закодированы по крайней мере пять различных GRK и четыре аррестина; каждая GRK способна десенситизировать многие серпентиновые рецепторы, а каждый аррестин может взаимодействовать с многими фосфорилированными рецепторами разного типа.

Циклический АМР действует как вторичный мессенджер для некоторых регуляторных молекул

Адреналин — только один из многих гормонов, факторов роста и других регуляторных молекул, которые действуют, изменяя концентрацию сАМР внутри клетки и соответственно активность РКА (табл. 12-3). Например, глюкагон

связывается со своим рецептором на плазматической мембране адипоцитов, активируя (через G_s -белок) аденилатциклазу. РКА, активированная в результате увеличения концентрации сАМР, фосфорилирует и активирует два белка (перилипин и гормонзависимую триацилглицеринлипазу; см. рис. 17-3), ключевые для превращения депонированного жира в жирные кислоты, что приводит к мобилизации жирных кислот. Аналогичным образом пептидный гормон АКТГ (адренкортикотропный гормон, называемый также кортикотропином), производимый передней долей гипофиза, связывается со специфическими рецепторами коры надпочечника, активируя аденилатциклазу и вызывая таким образом увеличение концентрации сАМР. Затем РКА фосфорилирует и активирует несколько ферментов, необходимых для синтеза кортизола и других стероидных

Таблица 12-3	Некоторые сигналы, использующие сАМР в качестве вторичного мессенджера
Адреналин (β -адренергический)	
Гистамин [H_2]*	
Глюкагон	
Дофамин [D_1, D_2]*	
Кортикотропин (АКТГ)	
Кортикотропин-высвобождающий гормон (кортикотропин-рилизинг-гормон) (КРГ)	
Лютеинизирующий гормон (ЛГ)	
Меланоцитстимулирующий гормон (МСГ)	
Одоранты (множество)	
Паратиреоидный гормон	
Простагландины E1, E2 (PGE1, PGE2)	
Серотонин [5-НТ-1а, 5-НТ-2]*	
Соматостатин	
Усилители вкуса (сладкий, горький)	
Тиреотропный гормон (ТТГ)	
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	

* В квадратных скобках указаны подтипы рецепторов. Рецепторы разных подтипов могут иметь неодинаковые механизмы передачи сигнала. Например, в некоторых тканях рецепторы серотонина относятся к подтипам 5-НТ1а и 5-НТ1b, которые работают через аденилатциклазу и сАМР, а в других тканях рецепторы подтипа 5-НТ-1с действуют по механизму, включающему фосфолипазу С-IP₃ (табл. 12-4)

гормонов. Во многих типах клеток каталитическая субъединица РКА также может проникать в ядро, где она фосфорилирует белок **CREB** (от англ. *cAMP response element binding protein*), который изменяет экспрессию специфических генов, регулируемых сАМР.

Некоторые гормоны действуют, *ингибируя* аденилатциклазу, *понижая* уровень сАМР и *подавляя* фосфорилирование белка. Например, связывание соматостатина с рецептором приводит к активации **ингибиторного G-белка G_i**, гомологичного белку G_s; G_i ингибирует аденилатциклазу и понижает концентрацию сАМР. Эффект соматостатина, таким образом, служит противовесом действию глюкагона. В жировой ткани простагландин E1 (PGE1; см. рис. 10-18) ингибирует аденилатциклазу, вследствие этого концентрация сАМР понижается, а мобилизация

липидных резервов под влиянием адреналина и глюкагона замедляется. В некоторых других тканях PGE1 стимулирует синтез сАМР, так как его рецепторы сопряжены с аденилатциклазой через стимулирующий G-белок G_s. В тканях с α_2 -адренергическими рецепторами адреналин понижает концентрацию сАМР, поскольку α_2 -рецепторы сопряжены с аденилатциклазой через ингибирующий G-белок G_i. Короче говоря, внеклеточное сигнальное вещество, такое как адреналин или PGE1, может оказывать совершенно различные эффекты на ткани или клетки в зависимости от трех факторов: рецепторов в этой ткани, G-белка (G_s или G_i), с которым сопряжен рецептор, и набора ферментов-мишеней РКА в клетках. Используя все факторы, приводящие к повышению и понижению концентрации сАМР, клетка достигает той интеграции сигналов, которую мы определили как главную особенность механизмов передачи сигнала (рис. 12-1, з).

Четвертый фактор, объясняющий, как один вторичный мессенджер (сАМР) может опосредовать так много сигналов, — это ограничение процесса сигнализации определенной областью клетки с помощью **белков-адаптеров** (некаталитических белков, которые удерживают вместе другие белковые молекулы, работающие согласованно; см. ниже). **Белки, закоряивающие киназу А** (от англ. *A kinase anchoring proteins* — **АКАР**), являются «бивалентными»; одна часть связывается с R-субъединицей РКА (рис. 12-6, а), а другая со специфической структурой внутри клетки, удерживая РКА вблизи этой структуры. Например, специфические АКАР связывают РКА с микротрубочками, актиновыми филаментами, Ca²⁺-каналами, митохондриями и ядром. Разные типы клеток содержат различные АКАР, так что сАМР имеет возможность стимулировать фосфорилирование митохондриальных белков в одной клетке и фосфорилирование актиновых филаментов в другой. В некоторых случаях АКАР связывает РКА с ферментом, вызывающим активацию РКА (аденилатциклаза) или останавливающим ее действие (сАМР-фосфодиэстераза или фосфопротеинфосфатаза) (рис. 12-9). Близкое соседство активирующих и ингибирующих ферментов, по всей вероятности, необходимо для достижения очень быстрого локального ответа. В дальнейшем мы увидим, что некоторые сигнальные мембранные белки

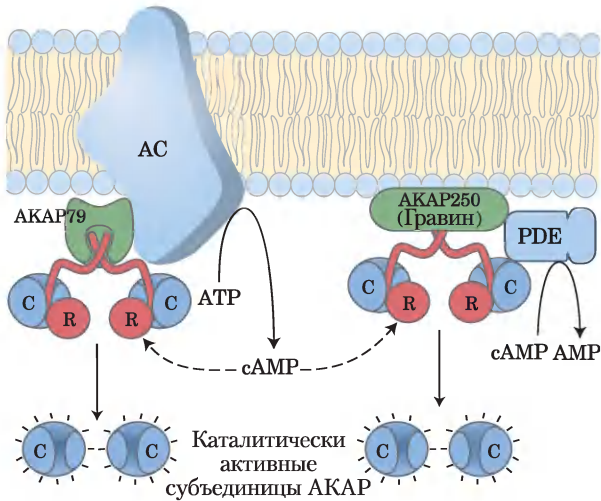


Рис. 12–9. Нуклеация надмолекулярных комплексов белками, заякоривающими киназу А (АКАР). Несколько типов АКАР (зеленый) выступают в роли многовалентных каркасов, удерживая каталитические субъединицы РКА (синий) путем взаимодействия с регуляторными субъединицами РКА (красный) вблизи определенных органелл или участков клетки. АКАР79 на цитоплазматической стороне плазмалеммы связывает РКА и аденилатциклазу (АС). сАМР, который производит аденилатциклаза, быстро и практически без потерь достигает находящейся поблизости РКА. АКАР79 также может связывать саму РКА (не показано), ее целевой белок (ионный канал) и фосфопротеинфосфатазу, дефосфорилирующую целевой белок. АКАР250 (гравин) прикрепляет РКА к плазмалемме и связывает сАМР-фосфодиэстеразу (PDE), которая подавляет сигнал РКА, превращая сАМР в АМР. В обоих случаях АКАР создает высокую локальную концентрацию ферментов и вторичных мессенджеров, локализуя таким образом сигнальную цепь.

(включая аденилатциклазу) локализованы в определенных участках мембраны в рафтах или кавеолах (см. разд. 12-5).

Для проведения исчерпывающего изучения механизмов передачи сигнала исследователь должен владеть достаточно точными инструментами, позволяющими изучать пространственно-временные аспекты функционирования системы передачи сигнала на уровне субклеточной организации и в режиме реального времени. При анализе внутриклеточной локализации биохимических процессов биохимия смыкается с клеточной биологией, а находящиеся на стыке этих областей методы играют неосценимую роль в изучении путей передачи сигналов. Например, в таких исследованиях широко используются флуоресцентные зонды. Связывание функциональных белков с такими метками, как зеленый флуоресцентный белок (GFP), позволяет установить их локализацию в клетке (см. рис. 9-15, а). Связывание двух белков (например, R- и C-субъединиц РКА) можно наблюдать, измеряя энергию флуоресценции при переносе флуоресцентной метки от одного белка к другому (этот метод называется резонансным переносом энергии флуоресценции, FRET, см. доп. 12-3).

Диацилглицерин, инозиттрисфосфат и Ca^{2+} служат вторичными мессенджерами

Еще один большой класс GPCR — рецепторы, через G-белки сопряженные с **фосфолипазой С** (PLC) плазматической мембраны, которая специфична в отношении содержащегося в плазматической мембране липида фосфатидилинозит-4,5-бисфосфата (см. рис. 10-16). Когда гормон этого класса (табл. 12-4) связывается со специфици-

Таблица 12-4 Некоторые сигнальные вещества и стимулы, действие которых опосредовано фосфолипазой С и IP_3

АТР [P_{2x} и P_{2y}]*	Вазопрессин	Свет (<i>y Drosophila</i>)
α_1 -Адренергические агонисты	Гастрин-высвобождающий пептид	Серотонин [5-НТ-1с]*
Ангиотензин II	Гистамин [H_1]*	Тиреотропин-высвобождающий гормон (ТРГ)
Ангиогенин	Глутамат	Фактор роста из тромбоцитов (PDGF)
Ауксин	Гонадотропин-высвобождающий гормон (ГРГ)	
Ацетилхолин (мускариновый M_1)	Окситоцин	

* В квадратных скобках подтипы рецепторов; см. примечание к табл. 12-3.

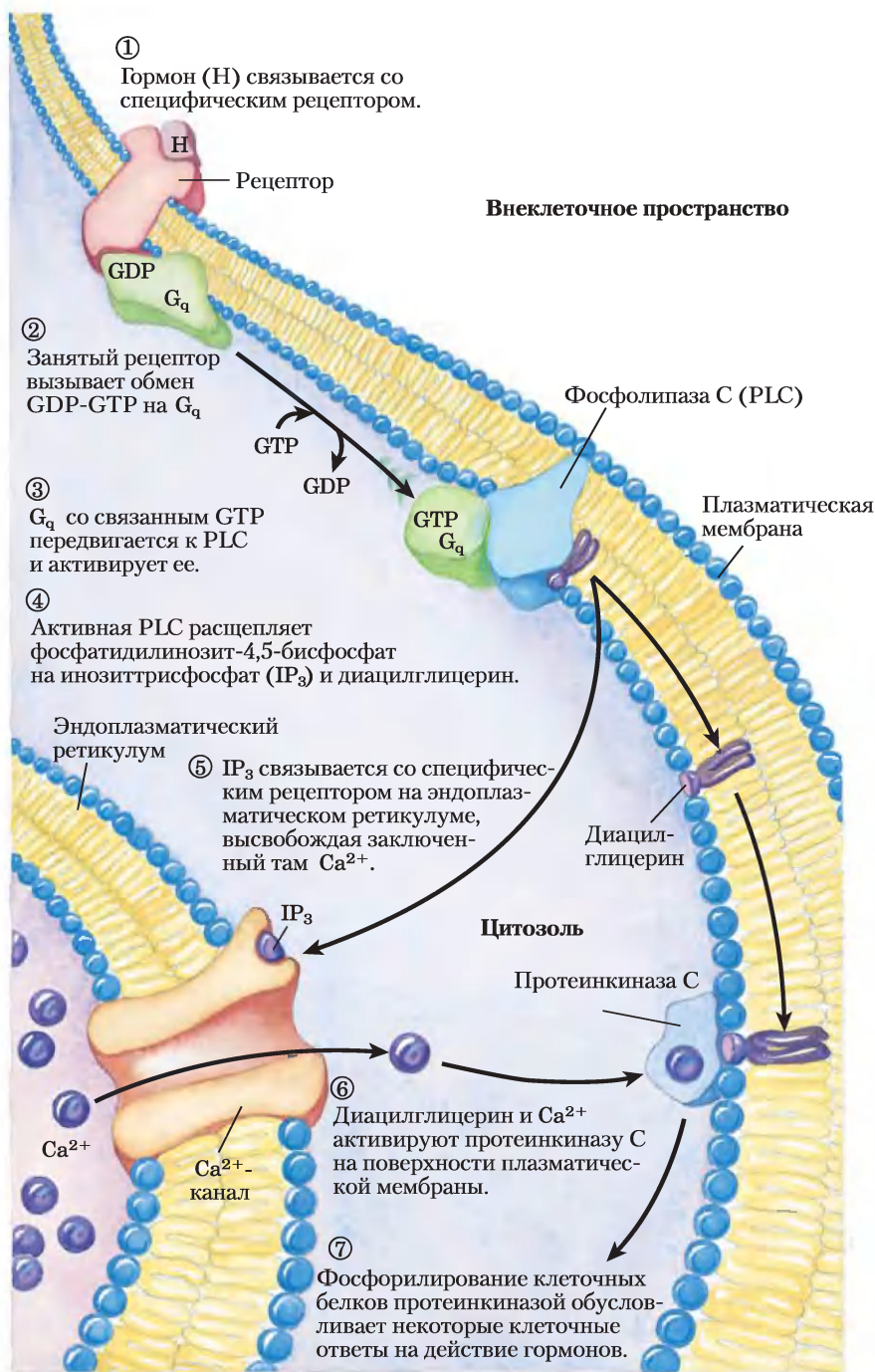
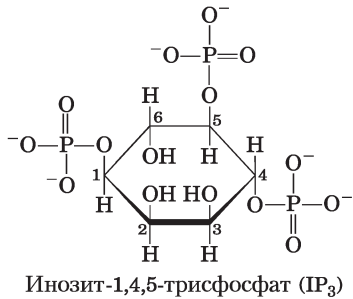



Рис. 12-10. Активируемая гормоном фосфолипаза C и IP_3 . Гормончувствительная фосфатидилинозитная система продуцирует два внутриклеточных вторичных мессенджера: инозит-1,4,5-трисфосфат (IP_3) и диацилглицерин. Оба вещества необходимы для активации протеинкиназы C. Увеличивая концентрацию Ca^{2+} в цитозоле, IP_3 активирует также другие Ca^{2+} -зависимые ферменты; таким образом, Ca^{2+} тоже действует как вторичный мессенджер.

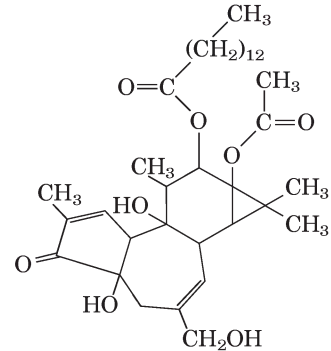
ческим рецептором на плазматической мембране (рис. 12-10, стадия ①), комплекс гормон–рецептор катализирует обмен ГТФ–ГДП на ассоциированном G-белке G_q (стадия ②), активируя его практически так же, как β -адренергический рецептор активирует G_s (рис. 12-4). Активированный G_q в свою очередь активирует специфичную для PIP_2 PLC (рис. 12-10, стадия ③), которая катализирует (стадия ④) образование двух мощных вторичных мессенджеров: диацилглицерина и **инозит-1,4,5-трифосфата**, или **IP_3** (не путать с PIP_3 , с. 622).



Растворимый в воде инозиттрифосфат диффундирует из плазматической мембраны в эндоплазматический ретикулум, где связывается со специфическими рецепторами IP_3 и заставляет открыться Ca^{2+} -каналы, находящиеся в ЭР. Вследствие этого в цитозоль высвобождается Ca^{2+} (стадия ⑤), концентрация Ca^{2+} в цитоплазме резко возрастает до $\sim 10^{-6}$ М. Одним из эффектов увеличения концентрации Ca^{2+} является активация **протеинкиназы С (РКС)**. При активации РКС диацилглицерин кооперируется с Ca^{2+} , также действуя как вторичный мессенджер (стадия ⑥). РКС фосфорилирует остатки Ser или Thr специфических белков-мишеней, изменяя их каталитическую активность (стадия ⑦). Существует несколько изоферментов РКС, каждый из них имеет характерное распределение по тканям, специфичность к белкам-мишеням и различные функции в клетке. Среди мишеней — белки цитоскелета, ферменты и ядерные белки, регулирующие экспрессию генов. Все это семейство ферментов отличается широким спектром активностей, например они влияют на процессы в нервной и иммунной системах, а также регулируют деление клеток.

 Действие группы соединений, известных как **промоторы опухолей**, определяется их влиянием на РКС. Наиболее изучены фоболо-

вые эфиры — синтетические соединения, мощные активаторы РКС. По-видимому, они имитируют действие клеточного диацилглицерина как вторичного мессенджера, но, в отличие от природных диацилглицеринов, не могут быстро разрушаться. Путем непрерывной активации РКС эти синтетические промоторы опухолей вмешиваются в нормальную регуляцию роста и деления клеток (см. обсуждение в разд. 12.12) и тем самым провоцируют развитие опухолей. ■



Миристоилфорболацетат
(форболовый эфир)

Кальций является вторичным мессенджером для многих сигнальных путей

Существует множество вариантов сигнализации с участием ионов кальция. Во многих клетках, отвечающих на внеклеточные сигналы, Ca^{2+} служит вторичным мессенджером, приводящим в действие внутриклеточные ответы, такие как экзоцитоз в нейронах и клетках эндокринной системы, сокращение мышц и перестройку цитоскелета в процессе амебоидного движения. В норме концентрация Ca^{2+} в цитозоле сохраняется очень низкой ($< 10^{-7}$ М) благодаря действию Ca^{2+} -насосов в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), митохондриях и плазматической мембране. Гормоны, нервные импульсы или другие стимулы вызывают либо вход Ca^{2+} в клетку через специфические Ca^{2+} -каналы в плазматической мембране, либо высвобождение кальция из ЭР или митохондрий; в каждом случае происходит увеличение содержания Ca^{2+} в цитозоле и запуск клеточного ответа.

Изменения концентрации Ca^{2+} воспринимаются Ca^{2+} -связывающими белками, регулирую-

Дополнение 12-3 МЕТОДЫ FRET: Биохимия, которую можно увидеть в живой клетке

Флуоресцентные зонды широко используются для обнаружения быстрых биохимических изменений в отдельных живых клетках. Их можно применять для мгновенной (в пределах наносекунд) регистрации изменений внутриклеточной концентрации вторичного мессенджера или активности протеинкиназы. Более того, флуоресцентная микроскопия имеет достаточно высокое разрешение, что позволяет выявить, где именно в клетке происходят такие изменения. В одной из широко применяемых методик флуоресцентные зонды делают на основе природного белка — **зеленого флуоресцентного белка (GFP)**, от англ. *green fluorescent protein*) медузы *Aequorea victoria* (рис. 1).

При поглощении кванта света GFP испускает фотон (т. е. флуоресцирует) в зеленой области спектра. Белок GFP состоит из 11 нитей, собранных в β -цилиндр, в центре которого флуорофор (группа, поглощающая и испускающая фотоны) — трипептид Ser⁶⁵–Tyr⁶⁶–Gly⁶⁷ (рис. 2). Окисление трипептида катализируется самим зеленым флуоресцентным белком GFP (рис. 3), так что



Рис. 1. Медуза *Aequorea victoria*, часто встречающаяся в Пьюджет Саунд, шт. Вашингтон, США.

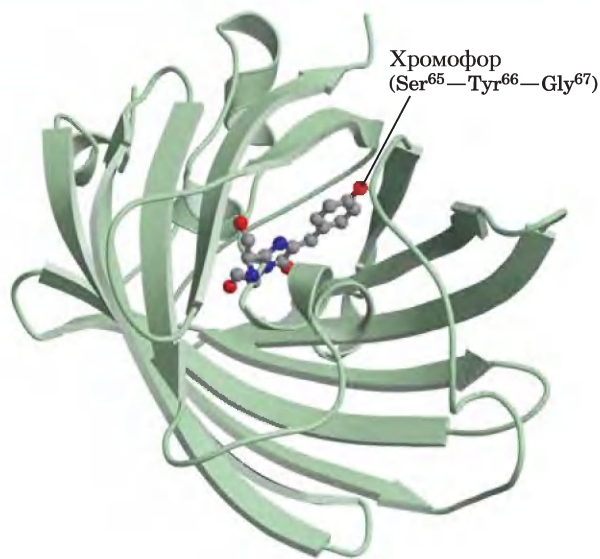


Рис. 2. Зеленый флуоресцентный белок (GFP) и шаростержневая модель его флуорохрома (из PDB ID 1 GFL).

для осуществления реакции не требуется никакого дополнительного белка или кофактора (кроме молекулярного кислорода). Поэтому GFP можно клонировать практически в любой клетке, где он может служить в качестве флуоресцентного маркера, например в виде слитого белка с каким-либо другим белком (см. рис. 9-15, *a*).

Генно-инженерными манипуляциями с геном GFP созданы варианты этого белка с различными спектрами флуоресценции. Например, в желтом (*yellow*) флуоресцентном белке (YFP) при замещении остатка Ala²⁰⁶ на Lys изменяются длины волны поглощения света и флуоресценции. Другие варианты GFP испускают синий (*blue*, BFP) или голубой (*cyan*, CFP) свет, а родственный белок (mRFP1) флуоресцирует в красной области (рис. 4). GFP и его варианты — это компактные структуры, которые сохраняют способность при укладке принимать нативную конформацию β -цилиндра даже при слиянии с другим белком. Исследователи используют эти гибридные флуоресцентные белки как реперные точки «спектральной линейки» при определении расстояния между взаимодействующими компонентами клетки и (косвенном) измерении концентрации веществ, вызывающих изменение расстояния между двумя белками.

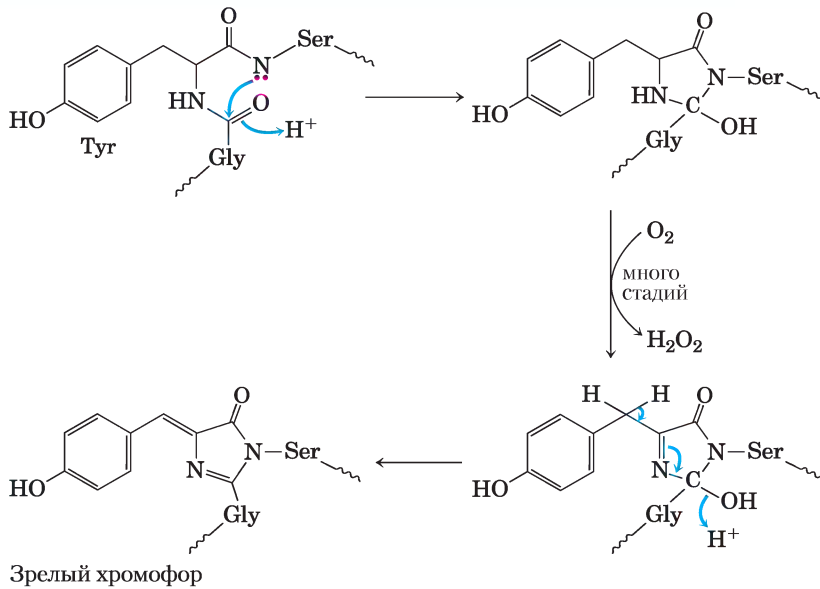


Рис. 3. Основу хромофорной группы GFP составляет последовательность аминокислот: – Ser⁶⁵–Tyr⁶⁶–Gly⁶⁷–. При созревании хромофора происходит внутренняя перегруппировка, сопряженная с окислительной реакцией, протекающей в несколько стадий. Здесь представлен механизм этого процесса в сокращенном виде.

Возбужденная флуоресцентная молекула, такая как GFP или YFP, может высвободить энергию поглощенных фотонов: (1) путем флуоресценции – испускаемые фотоны имеют немного большую длину волны (более низкую энергию), чем возбуждающий свет, или

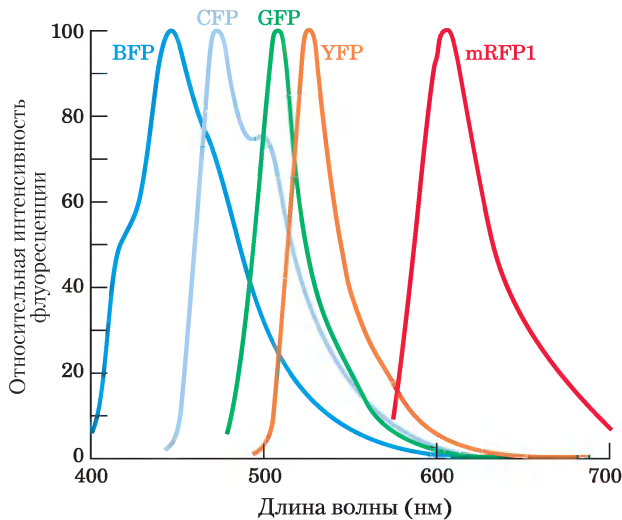


Рис. 4. Спектры испускания для вариантов GFP.

(2) безызлучательным путем. Явление безызлучательной энергетической передачи лежит в основе метода FRET (от англ. *fluorescence resonance energy transfer* – флуоресцентный резонансный перенос энергии). При этом энергия возбужденной молекулы (донора) передается непосредственно на соседнюю молекулу (акцептор), без эмиссии фотона, переводя акцептор в возбужденное состояние (рис. 5). Теперь акцептор может вернуться в основное состояние путем флуоресценции; испущенный фотон имеет большую длину волны (более низкую энергию), чем первоначальный возбуждающий свет и флуоресценция донора. Этот второй путь гашения возбуждения (FRET) возможен, только если донор и акцептор расположены поблизости друг от друга (на расстоянии от 1 до 50 Å). Чувствительность метода FRET очень сильно зависит от расстояния между донором и акцептором – обратно пропорциональна *шестой степени* этого расстояния. Таким образом, очень малые изменения расстояния между донором и акцептором регистрируются в методе FRET как очень большой сигнал. При наличии достаточно чувствительных оптических детекторов этот флуоресцентный сигнал можно измерять прямо в заданных участках отдельной живой клетки.

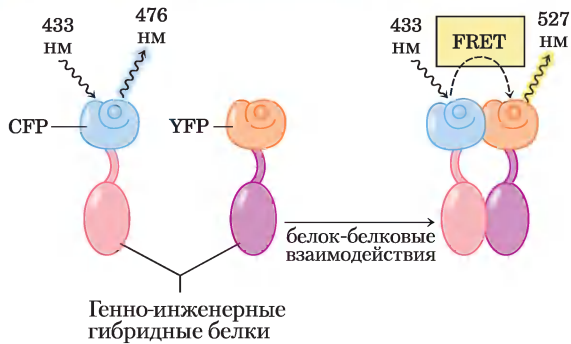
Дополнение 12-3 **МЕТОДЫ** FRET: Биохимия, которую можно увидеть в живой клетке (продолжение)

Рис. 5. Когда белок-донор (CFP) возбуждается монохромным светом с длиной волны 433 нм, он флуоресцирует при 476 нм (слева). Когда белок (красный цвет), слитый с CFP, взаимодействует с белком (фиолетовый), слитым с YFP, это взаимодействие сближает CFP и YFP в достаточной степени, чтобы стал возможным флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) между ними. Теперь, поглощая свет с длиной волны 433 нм, CFP не флуоресцирует при 476 нм, а прямо передает энергию белку YFP, который флуоресцирует на характерной длине волны 527 нм. Отношение интенсивностей флуоресценции при 527 нм и 476 нм характеризует взаимодействие красного и фиолетового белков.

Метод FRET использовали для измерения концентрации cAMP в живых клетках. Ген GFP слили с геном регуляторной субъединицы (R) cAMP-зависимой протеинкиназы, а ген BFP слили с геном каталитической субъединицы (C) (рис. 6). Когда эти два гибридных

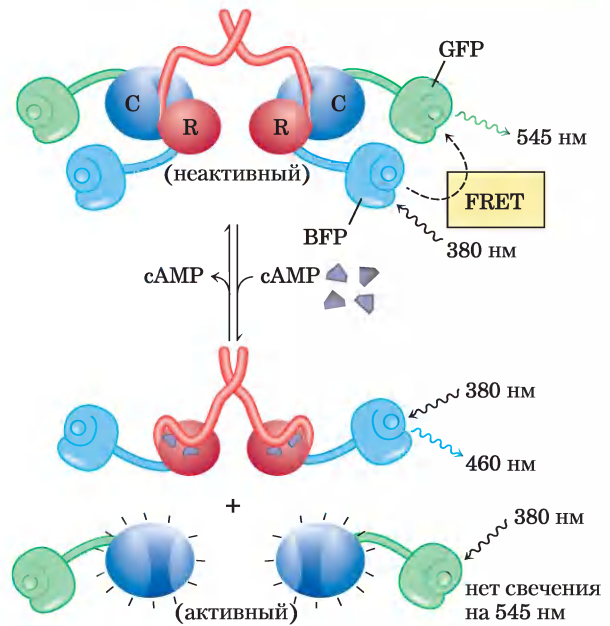


Рис. 6. Измерение концентрации cAMP методом FRET. В результате слияния генов создаются гибридные белки, между которыми возможен резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), когда каталитическая и регуляторная субъединицы PKA ассоциированы (низкая концентрация cAMP). Когда содержание cAMP увеличивается, субъединицы расходятся, и FRET прекращается. Отношение эмиссии при 460 нм (состояние диссоциации) к эмиссии при 545 нм (состояние комплекса) служит чувствительной мерой концентрации cAMP.

ыми множеством Ca^{2+} -зависимых ферментов. **Кальмодулин (CaM; $M_r = 17\ 000$)** — кислый белок с четырьмя высокоаффинными Ca^{2+} -связывающими центрами. Когда содержание Ca^{2+} в клетке повышается до $\sim 10^{-6}$ М (~ 1 мкМ), присоединение Ca^{2+} к кальмодулину вызывает в этом белке конформационное изменение (рис. 12-11, а). Кальмодулин связывается с множеством белков и при присоединении к нему Ca^{2+} модулирует их активность (рис. 12-11, б). Кальмодулин — член семейства Ca^{2+} -связывающих белков, туда же относятся тропонин (с. 247), инициирующий сокращение скелетных мышц в ответ на увеличение концентрации ионов кальция. Для этого семейства характерна Ca^{2+} -связывающая структура — «EF-рука» (рис. 12-11, в).

Кальмодулин — интегральная субъединица в составе **Ca^{2+} /кальмодулинзависимых протеинкиназ (CaM-киназы I–IV)**. Когда в ответ на какой-либо стимул внутриклеточная концентрация Ca^{2+} увеличивается, кальмодулин связывает Ca^{2+} , претерпевает конформационное изменение и активирует CaM-киназу. Эта киназа затем фосфорилирует ряд ферментов-мишеней, регулируя их активность. Кальмодулин служит также регуляторной субъединицей мышечной киназы фосфорилазы *b*, которая активируется ионами Ca^{2+} . Таким образом, Ca^{2+} вызывает АТФ-зависимые сокращения мышц, активируя в то же время и распад гликогена, обеспечивающий «топливом» синтез АТФ. Известно, что многие другие фер-

белка экспрессируются в клетке, BFP (донор; возбуждение при 380 нм, испускание при 460 нм) и GFP (акцептор; возбуждение при 475 нм, испускание при 545 нм) в неактивной PKA (тетрамер R_2C_2) достаточно близки, чтобы использовать FRET. Везде, где в клетке увеличивается содержание cAMP, комплекс R_2C_2 диссоциирует на R_2 и $2C$, и сигнал FRET пропадает, поскольку донор и акцептор теперь слишком удалены друг от друга. При наблюдении с помощью флуоресцентного микроскопа в области более высокой концентрации cAMP обнаруживается минимальный сигнал флуоресценции GFP и большой сигнал от BFP. Измерение отношения испускания при 460 и 545 нм позволяет точно измерить изменение концентрации cAMP. Определяя это отношение по всей клетке, можно получить цветное изображение клетки, где интенсивность окраски передает относительную концентрацию cAMP. Изображения, регистрируемые через определенные временные интервалы, дают картину изменений содержания cAMP во времени.

Вариант этого метода был использован для измерения ферментативной активности PKA в живой клетке (рис. 7). Исследователи создали мишень для PKA, синтезировав гибридный белок, содержащий четыре домена: YFP (акцептор); короткий пептид с остатком Ser, окруженным консенсусной последовательностью для PKA; P-Ser-связывающий домен (называемый 14-3-3); и CFP (донор). Когда остаток Ser не фосфорилирован, домен 14-3-3 не обладает сродством к нему, и

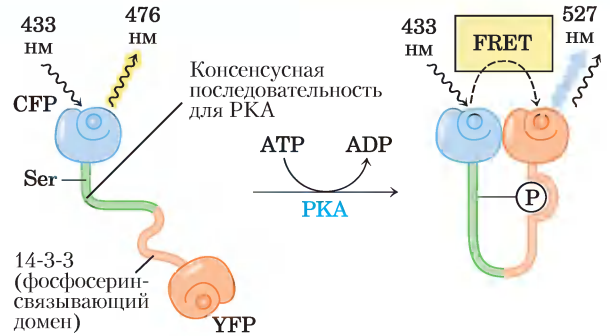


Рис. 7. Измерение активности PKA методом FRET. Созданный с помощью генной инженерии белок связывает YFP и CFP через пептид, содержащий остаток Ser, рядом с которым находятся консенсусная последовательность для фосфорилирования PKA и фосфосеринсвязывающий домен 14-3-3. Активная PKA фосфорилирует остаток Ser, который состыковывается с 14-3-3-связывающим доменом, что приводит флуоресцирующие белки в достаточную близость для возникновения FRET, что указывает на присутствие активной PKA.

гибридный белок существует в вытянутой форме, при этом донор и акцептор слишком удалены друг от друга, чтобы генерировать сигнал FRET. Повсюду, где в клетке активна PKA, она фосфорилирует остаток Ser в гибридном белке, и 14-3-3 связывается с P-Ser. Благодаря этому YFP и CFP приближаются друг к другу, и сигнал FRET фиксируется с помощью флуоресцентного микроскопа, указывая на присутствие активной PKA.

менты тоже регулируются ионами Ca^{2+} при помощи кальмодулина (табл. 12-5). Активность Ca^{2+} как вторичного мессенджера, подобно активности cAMP, можно ограничить на какой-либо территории; после того как его высвобождение вызвало локальный ответ, ионы Ca^{2+} обычно удаляют, прежде чем они диффундируют в отдаленные части клетки.

Очень часто концентрация Ca^{2+} не просто увеличивается и потом уменьшается, а, скорее, колеблется с периодом в несколько секунд (рис. 12-12), даже когда концентрация гормона снаружи клетки остается постоянной. Механизм, лежащий в основе колебания концентрации ионов кальция, по-видимому, связан с регуляцией по типу обратной свя-

зи либо фосфолипазы, которая генерирует IP_3 , либо ионного канала, который отвечает за высвобождение Ca^{2+} из ЭР, либо и того, и другого. Каким бы ни был механизм, эффект заключается в том, что один вид сигнала (например, концентрация гормона) превращается в другой (частота и амплитуда колебаний внутриклеточного содержания Ca^{2+}). Возможна и другая картина с локальными «пятнами», «облаками» или «волнами» ионов кальция — временное увеличение концентрации ионов Ca^{2+} , ограниченные определенным отделом клетки (рис. 12-13). Сигнал Ca^{2+} ослабевает по мере того, как ионы кальция диффундируют от кальциевого канала, удерживаются в ЭР или выкачиваются из клетки.

Сигнальные системы с участием Ca^{2+} и сАМР связаны между собой. В некоторых тканях ионы кальция стимулируют как аденилатциклазу, производящую сАМР, так и фосфодиэстеразу, разрушающую сАМР. Следовательно, временные и локальные изменения концентрации ионов кальция могут приводить к временным и локальным изменениям концентрации сАМР. Мы уже упоминали, что сАМР-зависимый фер-

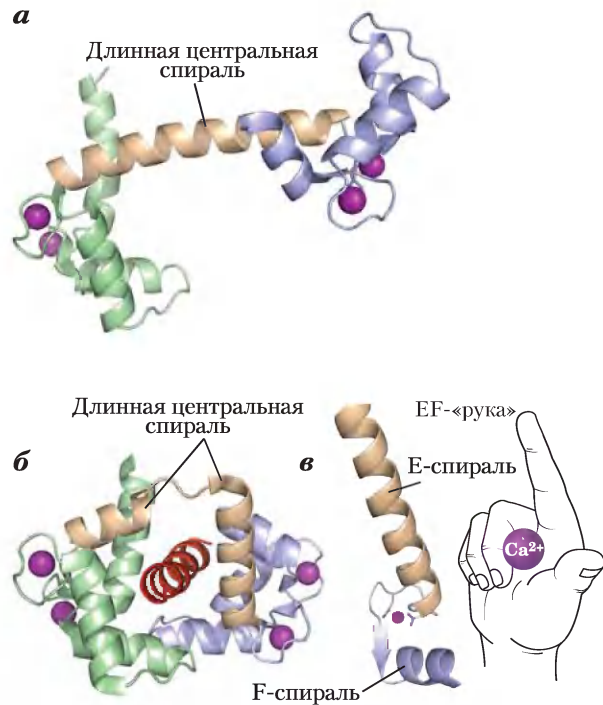


Рис. 12-11. Кальмодулин — белковый посредник для многих ферментативных реакций, стимулируемых ионами Ca^{2+} . Кальмодулин содержит четыре высокоаффинных Ca^{2+} -связывающих центра ($K_d \sim 0,1\text{--}1 \text{ мкМ}$). а) Ленточная модель кристаллической структуры кальмодулина (PDB ID 1CLL). Четыре Ca^{2+} -связывающих центра заняты ионами кальция (фиолетовый). Слева — N-концевой домен; справа — С-концевой домен. б) Кальмодулин, связанный со спиральным доменом (красный цвет) одного из многих белков, которые он регулирует, — кальмодулинзависимой протеинкиназой II (PDB ID 1CDI). Заметим, что длинная центральная α -спираль, видимая на (а), изгибается назад при связывании со спиральным доменом субстрата. В растворе центральная спираль, разумеется, более подвижна, чем в кристалле. в) Каждый из четырех Ca^{2+} -связывающих центров находится в структурном мотиве спираль–петля–спираль, называемом «EF-рукой», который присутствует также во многих других Ca^{2+} -связывающих белках.

Таблица 12-5	Некоторые белки, регулируемые Ca^{2+} и кальмодулином
	Ca^{2+} -АТРаза плазматической мембраны (Ca^{2+} -насос)
	Ca^{2+} -высвобождающий канал саркоплазматического ретикулума
	Ca^{2+} -зависимый Na^+ -канал (у <i>Paramecium</i>)
	Ca^{2+} /кальмодулинзависимые протеинкиназы (CaM-киназы с I по IV)
	сАМР-регулируемый обонятельный канал
	сАМР-фосфодиэстераза
	сGMP-регулируемые Na^+ -, Ca^{2+} -каналы (клетки палочек и колбочек)
	NAD ⁺ -киназа
	NO-синтаза (синтаза оксида азота)
	Аденилатциклаза (в головном мозге)
	Глутаматдекарбоксилаза
	Кальцинейрин (фосфопротеинфосфатаза 2B)
	Киназы легкой цепи миозина
	РНК-хеликаза (p68)
	Фосфоинозитид-3-киназа

мент РКА часто входит в состав строго локализованного надмолекулярного комплекса, образующегося вокруг каркасных белков, таких как АКАР. Внутриклеточная локализация ферментов-мишеней в сочетании с временным и пространственным градиентами концентрации Ca^{2+} и сАМР позволяет клетке отвечать на один или несколько сигналов соответствующими метаболическими изменениями во времени и в пространстве.

Краткое содержание раздела 12.2 РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С G-БЕЛКОМ, И ВТОРИЧНЫЕ МЕССЕНДЖЕРЫ

■ Сопряженные с G-белком рецепторы (GPCR) действуют через гетеротримерные G-белки. При связывании лиганда эти рецепторы катализируют обмен GTP на GDP, вызывая отделение α -субъединицы G-белка. Эта субъединица стимулирует или ингибирует целевой фермент, изменяя концентрацию его продукта — вторичного мессенджера.

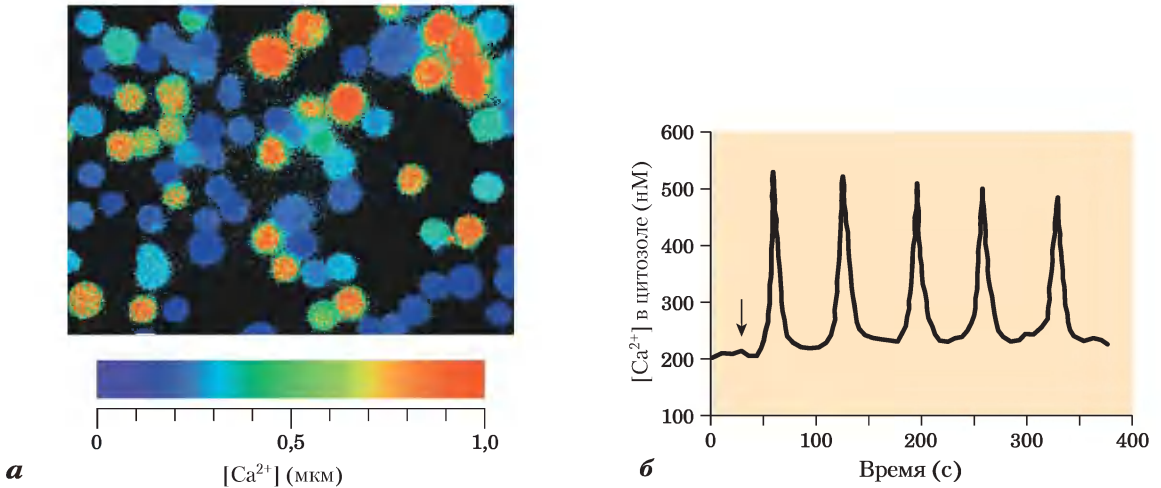


Рис. 12-12. Запуск колебаний внутриклеточной концентрации Ca^{2+} внеклеточными сигналами. а) Флуоресценция красителя (фура) меняется при связывании с Ca^{2+} . После диффузии этого красителя в клетки сразу же измеряли интенсивность флуоресценции методом флуоресцентной микроскопии. Интенсивность флуоресценции показана цветом; концентрацию Ca^{2+} можно оценить по цветовой шкале. В данном случае тимоциты (клетки тимуса — вилочковой железы) стимулировали экзогенным АТР, который повышает в них внутреннюю концентрацию Ca^{2+} . По своим ответам клетки оказались гетерогенны; некоторые имеют высокую внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} (красный цвет), другие — гораздо более низкую (голубой цвет). б) Когда такой зонд используется для измерения содержания Ca^{2+} в отдельном гепатоците, мы наблюдаем, что агонист норадреналин (момент добавления показан стрелкой) вызывает колебания концентрации Ca^{2+} от 200 до 500 нМ. В других типах клеток подобные колебания индуцируются другими внеклеточными сигналами.

- β -Адренергический рецептор активирует стимулирующий G-белок G_s , таким образом активируя аденилатциклазу и повышая концентрацию вторичного мессенджера сАМР. Циклический АМР стимулирует сАМР-зависимую протеинкиназу, она в свою очередь фосфорилирует ключевые белки, изменяя их активность.
- Ферментативные каскады, в которых одна молекула гормона активирует катализатор, который в свою очередь активирует другой катализатор и т. д., приводит к огромному усилению сигнала; это характерная особенность большинства систем, активируемых гормонами.
- Циклический АМР в итоге уничтожается фосфодиэстеразой сАМР, а G_s сам себя выключает, гидролизуя связанный GTP до GDP, т. е. он действует как ограничивающий себя бинарный выключатель.
- Если сигнал адреналина длительный, специфичная к β -адренергическому рецептору протеинкиназа и β -аррестин временно десенсибилизируют рецептор и заставляют его переместиться во внутриклеточные везикулы.
- Некоторые рецепторы стимулируют аденилатциклазу посредством G_s ; другие ингибируют ее посредством G_i . Таким образом, клеточная концентрация сАМР является общим ответом на действие двух (или более) сигналов.
- Некаталитические адаптерные белки, такие как АКАР, удерживают рядом белки, участвующие в одном сигнальном пути, что повышает эффективность взаимодействия этих белков, а в некоторых случаях определяет место протекания процесса внутри клетки.

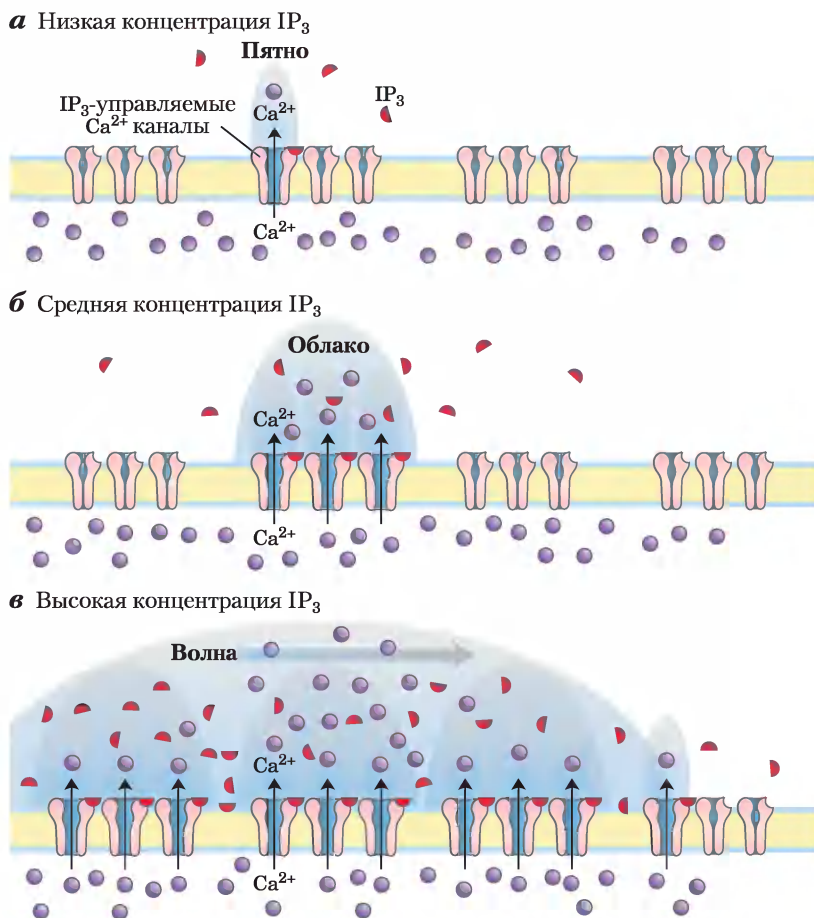


Рис. 12-13. Временное и строго локализованное повышение концентрации Ca^{2+} . а) IP_3 -управляемые кальциевые каналы эндоплазматического ретикулума организованы в виде кластеров, но каждый канал может независимо от остальных реагировать на сигнал IP_3 . Сравнительно слабый стимул, вызывающий незначительное повышение концентрации IP_3 , может заставить один канал быстро открыться, что приводит к временному и локальному появлению «пятна» кальция. б) Несколько более мощный стимул, вызывающий более сильное повышение концентрации IP_3 , может заставить открыться все кальциевые каналы данного кластера, в результате чего образуется «облако» Ca^{2+} , причем увеличение концентрации, его длительность и охват больше, чем в первом случае. в) Достаточно большое «облако» повышенной концентрации кальция может захватить соседние кластеры кальциевых каналов. Открытие каналов соседних кластеров приводит к усилению эффекта, в результате чего вдоль ЭР движется волна повышенной концентрации ионов кальция.

■ Некоторые GPCR действуют через фосфолипазу С плазматической мембраны, которая расщепляет PIP_2 , образуя диацилглицерин и IP_3 . Открывая Ca^{2+} -каналы в эндоплазматическом ретикулуме, IP_3 повышает концентрацию Ca^{2+} в цитозоле. Диацилглицерин и Ca^{2+} , действуя совместно, активируют протеинкиназу С, которая

фосфорилирует специфические клеточные белки и изменяет их активность. Внутриклеточная концентрация Ca^{2+} также регулирует (часто при участии кальмодулина) активность многих других ферментов и белков, участвующих в процессах секреции, перестройки цитоскелета или мышечного сокращения.

12.3. Рецепторные ферменты

Рецепторные тирозинкиназы (RTK) — большое семейство рецепторов, расположенных в плазматической мембране и обладающих собственной протеинкиназной активностью. Механизм передачи внеклеточных сигналов с помощью этих рецепторов принципиально отличается от механизма передачи сигнала при участии GPCR. Лигандсвязывающий домен RTK, расположенный на наружной поверхности плазматической мембраны, и активный центр фермента, расположенный на цитоплазматической поверхности, соединены между собой единственным трансмембранным доменом. Цитоплазматический домен представлен протеинкиназой (тирозинкиназой), которая фосфорилирует остатки Туг в специфических белках-мишенях. Прототипами белков этой группы являются рецептор инсулина и рецептор эпидермального фактора роста.

Стимуляция инсулинового рецептора запускает каскад реакций фосфорилирования белков

Инсулин регулирует и метаболизм, и экспрессию генов: сигнал идет от инсулинового рецептора на плазматической мембране к инсулинчувствительным метаболическим ферментам и к ядру, где он стимулирует транскрипцию специфических генов. Активный инсулиновый рецептор (INS-R) состоит из двух идентичных α -цепей, выступающих с внешней стороны плазматической мембраны, и двух трансмембранных β -субъединиц, С-концы которых направлены в цитозоль (рис. 12-14). α -Цепи содержат инсулинсвязывающий домен, а внутриклеточные домены β -цепей, обладающие протеинкиназной активностью, переносят фосфорильную группу от АТФ на гидроксильные группы остатков Туг в специфических белках-мишенях. Передача сигнала через инсулиновый рецептор начинается, когда связывание инсулина с α -цепями активирует тирозинкиназную активность β -цепей, и каждый $\alpha\beta$ -мономер фосфорилирует три ключевых остатка Туг вблизи С-конца β -цепи его партнера в димере. **Аутофосфорилирование** открывает активный центр таким образом, что фермент может фосфорилировать остатки Туг других белков-мишеней. Стимуляция инсулинового рецептора инициирует каскад реакций фосфори-

лирования белка. Механизм активации протеинкиназной активности инсулинового рецептора аналогичен таковому для РКА и РКС: участок цитоплазматического домена (ингибирующая последовательность), которая в норме закрывает активный центр, после фосфорилирования покидает активный центр и делает его доступным для связывания белков-мишеней (рис. 12-14).

Одним из таких белков-мишеней (рис. 12-15, стадия ①) является субстрат-1 инсулинового рецептора (IRS-1; стадия ②). Однократно фосфорилированный по своим Туг-остаткам, IRS-1 служит центром образования комплекса белков (стадия ③), который переносит информацию от инсулинового рецептора к конечным мишеням в цитозоле и ядре через целую серию промежуточных белков. Прежде всего, остаток \textcircled{D} -Туг в IRS-1 связывается **SH2-доменом** белка Grb2. (SH2 от англ. *Src homology 2* — аминокислотные последовательности SH2-доменов сходны с последовательностью домена в другой тирозинкиназе белков — Src; произносится «сарк»). Несколько сигнальных белков содержат SH2-домены, все они связывают остатки \textcircled{D} -Туг белка-партнера. В Grb2 есть также второй белоксвязывающий домен — SH3, который связывается с участками, богатыми остатками Pro. Grb2 связывается с богатой пролином областью Sos, вовлекая Sos в разрастающийся рецепторный комплекс. Связанный с Grb2, Sos выступает как фактор обмена гуанозинового нуклеотида (GEF), катализируя замещение связанного GDP на GTP в белке Ras (G-белке).

Ras — представитель семейства **малых G-белков**, которые опосредуют передачу множества разнообразных сигналов (доп. 12-2). Подобно тримерному G-белку, участвующему в β -адренергической системе передачи сигнала (рис. 12-5), белок Ras может находиться в активной конформации (в комплексе с GTP) и в неактивной конформации (в комплексе с GDP), однако Ras — мономер (~20 кДа). Когда GTP связывается, Ras может активировать протеинкиназу Raf-1 (рис. 12-15, стадия ④), первую из трех протеинкиназ — Raf-1, MEK и ERK, которые образуют ферментативный каскад, где каждая киназа активирует следующую путем фосфорилирования (стадия ⑤). Протеинкиназы MEK и ERK активируются при фосфорилировании остатков Thr и Туг. В активированном состоянии они опосредуют некоторые эффекты

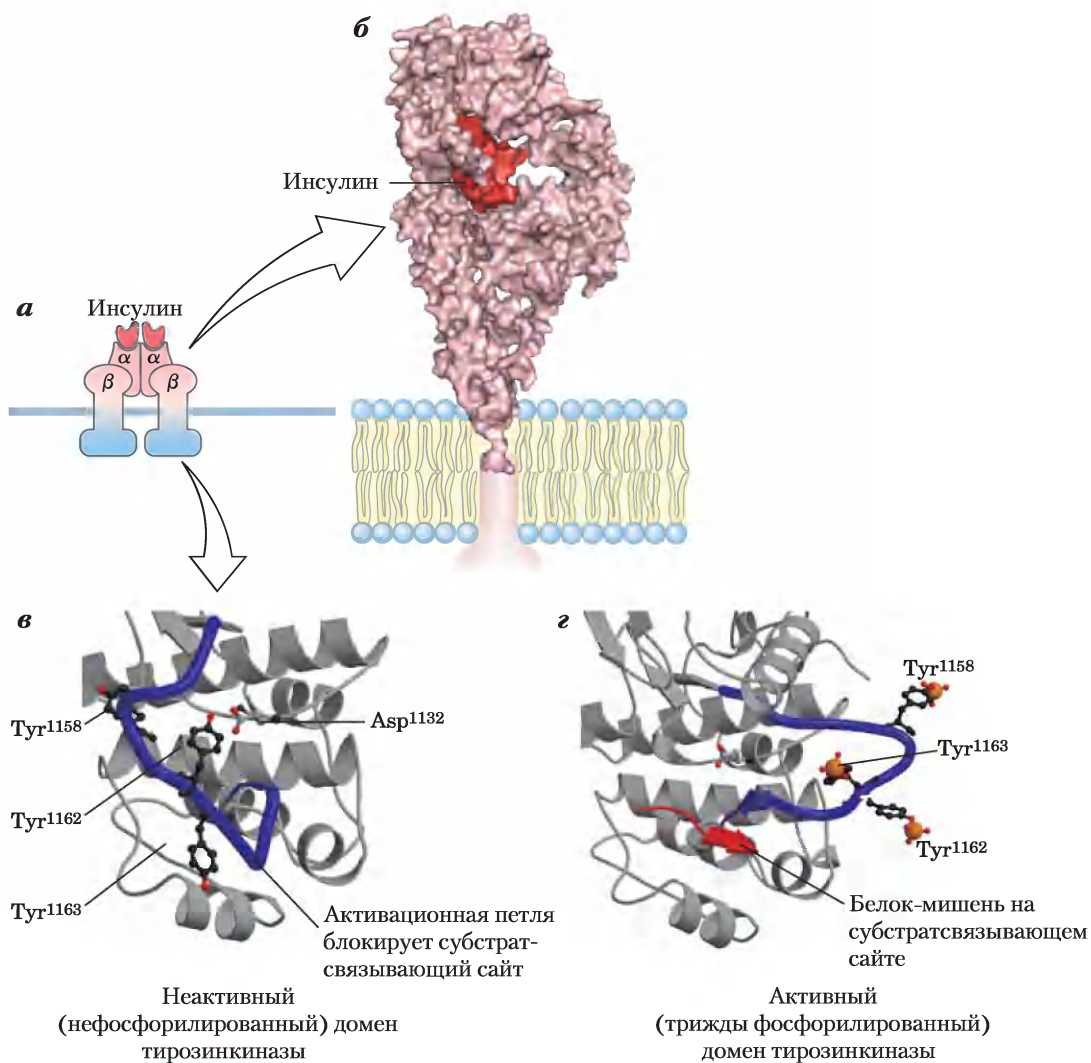


Рис. 12-14. Активация тирозинкиназы инсулинового рецептора аутофосфорилированием.

а Инсулинсвязывающий участок (розовый; изображен в виде контура поверхности кристаллической структуры; взято из PDB ID 2DTG) инсулинового рецептора находится вне клетки и состоит из **(б)** двух α -субъединиц и выступающих в цитозоль участков двух β -субъединиц. (Структуру трансмембранного домена не удалось установить методом РСА.) Информация о связывании инсулина (красный; PDB ID 2CEU) передается по единственной трансмембранной спирали каждой β -субъединицы к соответствующим тирозинкиназным доменам внутри клетки, в результате чего они активируются и фосфорилируют друг друга по трем остаткам тирозина. **в** В неактивной форме тирозинкиназного домена (PDB ID 1PK) активационная петля (синий цвет) находится в активном центре, и ни один из ключевых остатков Тур (черно-красные шаростержневые модели) не фосфорилирован. Эта конформация стабилизирована водородной связью между Тур¹¹⁶² и Asp¹¹³². **з** Активация тирозинкиназы позволяет каждой β -субъединице димера фосфорилировать три остатка Тур (Тур¹¹⁵⁸, Тур¹¹⁶² и Тур¹¹⁶³) на другой субъединице (PDB ID 1IR3). (Фосфорильные группы обозначены с помощью шаростержневой модели: атомы фосфора оранжевые, атомы кислорода красные.) Эффект трех заряженных остатков P-Tyr заключается в том, что активационная петля отклоняется на 30 Å от центра связывания субстрата, который получает возможность связывать и фосфорилировать белок-мишень (показан красной стрелкой).

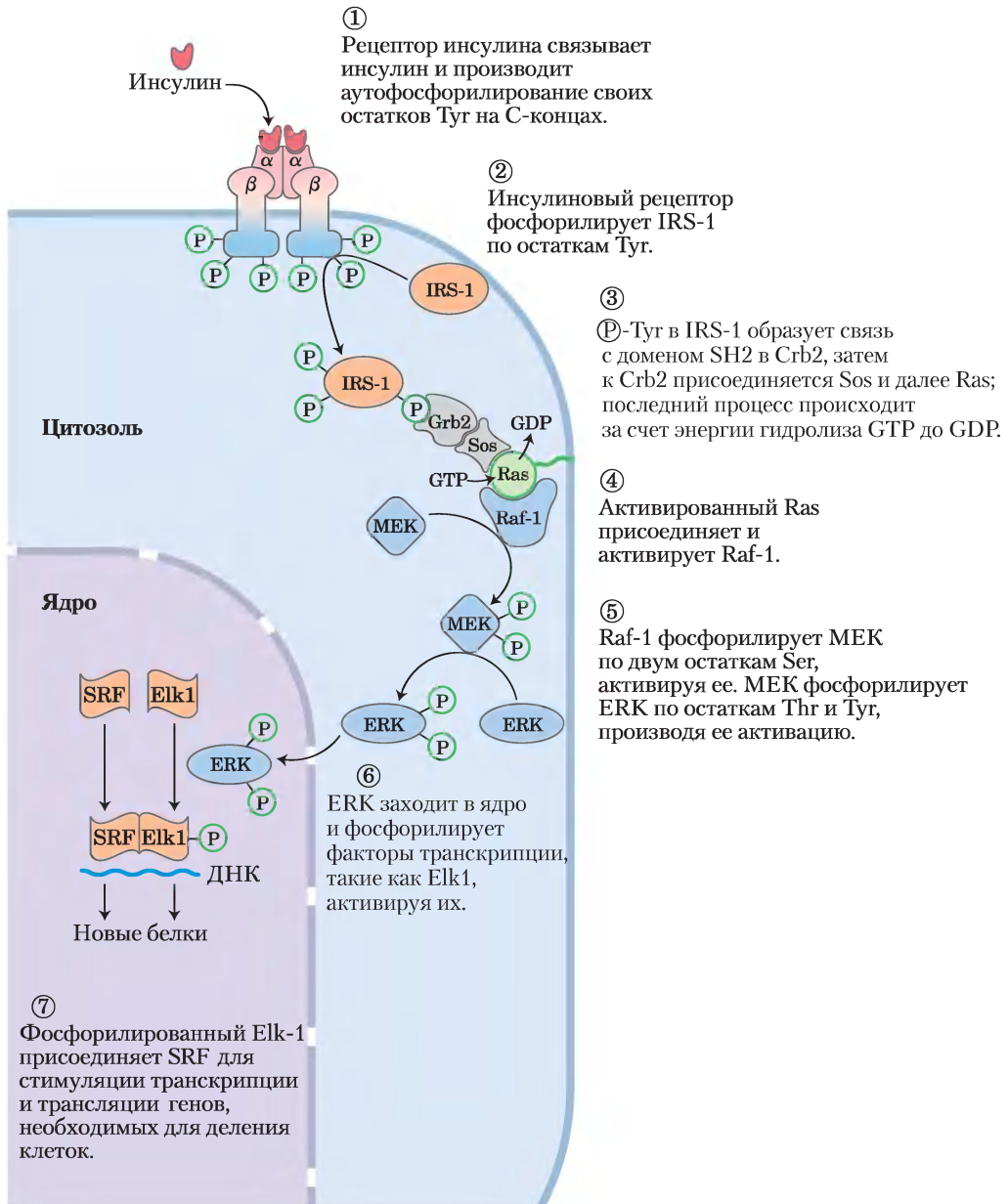


Рис. 12-15. Регуляция экспрессии генов инсулином. Рецептор инсулина (INS-R) состоит из двух α -цепей, расположенных на внешней стороне плазматической мембраны, и двух β -цепей, которые пересекают мембрану и выступают с внутренней стороны. Связывание инсулина с α -цепями вызывает конформационную перестройку, которая делает возможным аутофосфорилирование остатков Тир в С-концевом домене β -субъединиц. Аутофосфорилирование активирует тирозинкиназный домен, который затем катализирует фосфорилирование других белков-мишеней. Сигнальный путь, по которому инсулин регулирует экспрессию генов, состоит из каскада протеинкиназ, каждая из которых активирует следующую. Рецептор инсулина является тирозинспецифичной киназой; другие киназы (все окрашены в голубой цвет) фосфорилируют остатки Ser или Thr. MEK — киназа с двойной специфичностью, которая фосфорилирует остатки и Thr, и Tyr в ERK. ERK от англ. *extracellular regulated kinase* — внеклеточная регулируемая киназа; MEK — киназа, активируемая митогеном и активирующая ERK; SRF от англ. *serum response factor* — сывороточный фактор отклика.

инсулина: входя в ядро эти протеинкиназы фосфорилируют такие белки, как Elk1 (стадия ⑥), модулирующий транскрипцию почти 100 регулируемых инсулином генов (стадия ⑦).

Белки Raf-1, MEK и ERK — члены трех больших семейств. ERK относится к семейству **МАРК** (от англ. *mitogen-activated protein kinases*; митогены — это сигнальные вещества, которые действуют извне и индуцируют митоз и клеточное деление). Вскоре после открытия первой МАРК было обнаружено, что этот фермент активируется другой протеинкиназой, которую пришлось назвать киназой МАР-киназы (MEK также принадлежит к этому семейству); а когда была открыта третья киназа, которая активирует киназу МАР-киназы, ей дали немного нелепое название «МАР-киназа киназы киназы» (Raf-1 из этого семейства; рис. 12-15, стадия ④). Акронимы этих трех семейств менее громоздки: МАРК, МАРКК, МАРККК. Киназы семейств МАРК и МАРККК специфичны к остаткам Ser или Thr, а киназы МАРКК (здесь MEK) фосфорилируют в своих субстратах (МАРК, здесь ERK) остатки и Ser, и Thr.

В настоящее время биохимики понимают, что инсулиновый путь не единственный пример универсального механизма, по которому гормональные сигналы приводят к фосфорилированию ферментов-мишеней протеинкиназами способами, сходными с показанными на рис. 12-15. Мишенью для фосфорилирования часто служит другая протеинкиназа, которая затем фосфорилирует третью протеинкиназу и т. д. В результате каскад ферментативных реакций усиливает первоначальный сигнал на много порядков (см. рис. 12-1, б). **МАРК-каскады** (рис. 12-15) опосредуют передачу сигналов, вызванных различными ростовыми факторами, такими как тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и эпидермальный фактор роста (EGF). Еще одна общая схема, рассмотренная здесь на примере инсулинового рецептора, состоит в использовании адаптерных белков, соединяющих компоненты разветвленного сигнального пути.

Мембранный фосфолипид PIP_3 работает в одной из ветвей передачи сигнала инсулина

Путь передачи сигнала, инициированного инсулином, разветвляется на уровне суб-

страта IRS-1 (рис. 12-15, стадия ②). Белок Grb2 — не единственный белок, связывающийся с фосфорилированным IRS-1. Фермент фосфоинозитид-3-киназа (PI-3K) соединяется с IRS-1 через ее SH2-домен (рис. 12-16). Активированная таким образом, PI-3K превращает мембранный липид фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат (PIP_2 на рис. 10-16) в фосфатидилинозит-3,4,5-трисфосфат (PIP_3). Несущая на себе несколько зарядов «головка» PIP_3 выступает в цитоплазму, с этой «головки» начинается вторая ветвь сигнального пути, в которой задействован еще один каскад протеинкиназ. Когда с PIP_3 связана протеинкиназа В (PKB), она фосфорилируется и активируется другой протеинкиназой PDK1. Затем активированная PKB фосфорилирует остатки Ser или Thr своих белков-мишеней, один из которых — киназа 3-гликогенсинтазы (GSK3). В активной нефосфорилированной форме GSK3 фосфорилирует гликогенсинтазу, инактивируя ее и тем самым обеспечивая замедление синтеза гликогена. (Этот механизм — только часть процесса, описывающего влияние инсулина на метаболизм гликогена.) При фосфорилировании посредством PKB GSK3 инактивируется. Препятствуя таким образом инактивации гликогенсинтазы в печени и мышцах, каскад фосфорилирования белков, инициированный инсулином, стимулирует синтез гликогена (рис. 12-16). В мышцах PKB запускает движение транспортеров глюкозы (GLUT4) из внутриклеточных везикул к плазматической мембране, стимулируя поглощение глюкозы из крови (рис. 12-16, стадия ⑤; см. также доп. 11-2).



Протеинкиназа В участвует также в других сигнальных путях, включая тот, который запускается Δ^9 -тетрагидроканнабинолом (THC), активным ингредиентом марихуаны и гашиша. THC активирует CB_1 -рецептор в плазматической мембране нейронов головного мозга, запуская сигнальный каскад, в который входят МАР-киназы. Активация CB_1 проявляется как стимуляция аппетита — известный эффект употребления марихуаны. В организме лигандами CB_1 -рецептора являются эндоканнабиноиды, такие как анандамид, который служит для защиты мозга от токсического действия избыточной нервной активности, например эпилептических

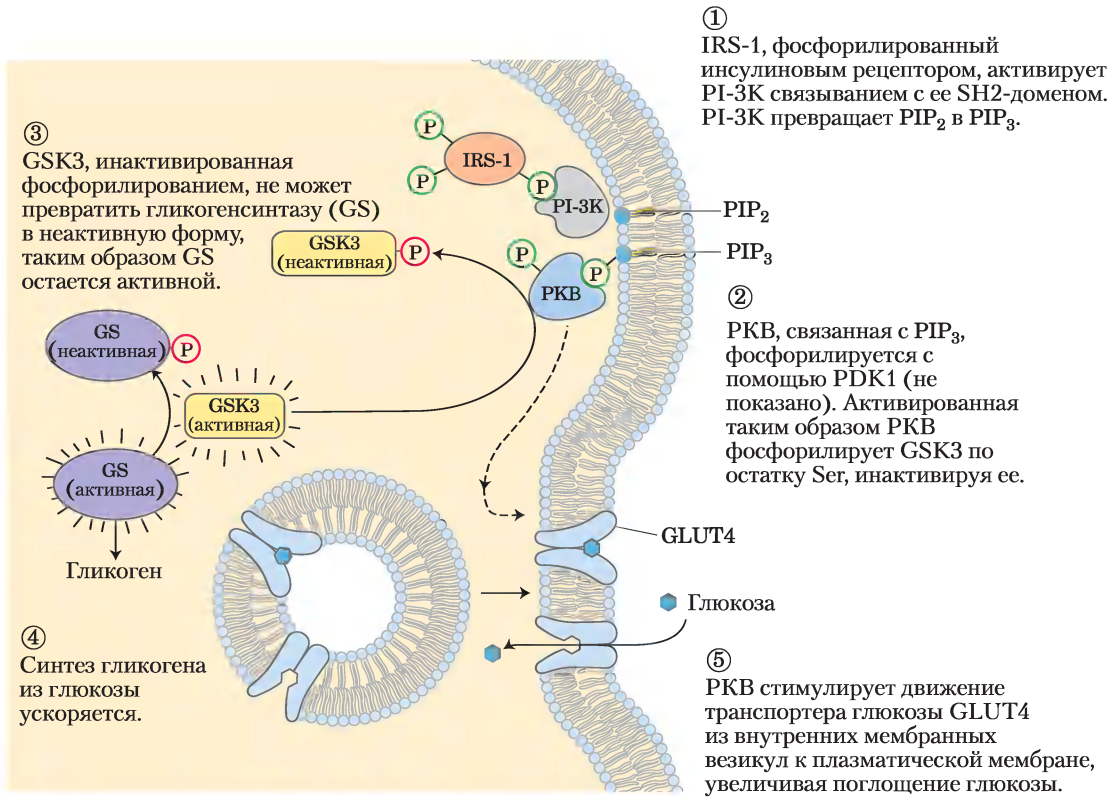
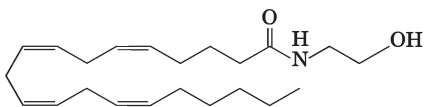
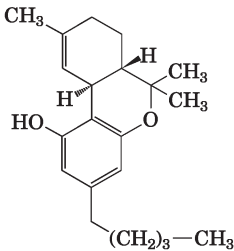


Рис. 12-16. Активация гликогенсинтазы инсулином. Передача сигнала опосредуется PI-3-киназой (PI-3K) и протеинкиназой B (PKB).

судорог. Гашиш веками использовался при лечении эпилепсии.



Как и во всех сигнальных путях, существует механизм прекращения передачи сигнала по каскаду PI-3K–PKB. PIP₃-специфичная фосфатаза (у человека PTEN) отщепляет от PIP₃ фосфат в

положении 3 с образованием PIP₂, который перестает быть лигандом для PKB, и сигнальный каскад прерывается. На поздних стадиях рака различной локализации опухолевые клетки часто имеют дефект в гене PTEN и вследствие этого имеют аномально высокий уровень PIP₃ и активности PKB. В результате, по-видимому, возникает непрекращающийся сигнал, побуждающий клетки к делению, а опухоль к росту. ■

Наряду с многочисленными рецепторами, действующими как протеинтирозинкиназы, целый ряд похожих на рецепторы белков в плазматической мембране обладают активностью протеинтирозинфосфатазы. По строению этих белков можно предположить, что их лиганды — компоненты внеклеточного матрикса или поверхностей других клеток. Хотя их роль в сигнализации пока еще до конца не понята, как и роль рецепторных тирозинкиназ, очевидно, что они могут обращать сигналы, стимулирующие эти киназы.

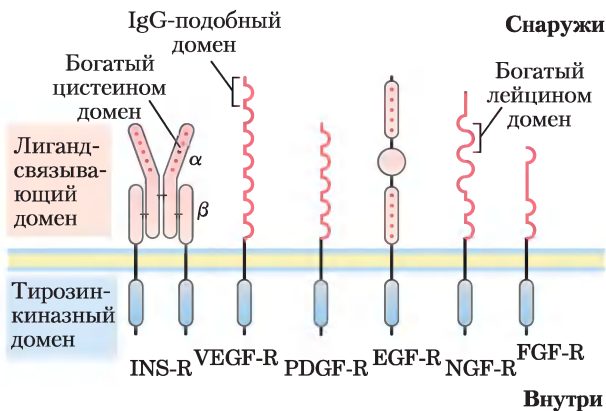


Рис. 12-17. Рецепторные тирозинкиназы. К рецепторам ростовых факторов, передающих сигнал посредством тирозинкиназной активности, относятся рецепторы инсулина (INS-R), фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF-R), фактора роста тромбоцитов (PDGF-R), фактора роста эпидермиса (EGF-R), фактора роста нервов (NGF-R) и фактора роста фибробластов (FGF-R). Все эти рецепторы содержат тирозинкиназный домен на цитоплазматической стороне плазматической мембраны (синий цвет). Внеклеточный домен у каждого рецептора свой, поскольку каждый рецептор обладает сродством только к определенному фактору роста. Эти внеклеточные домены обычно представляют собой комбинацию структурных мотивов, таких как богатые цистеином или лейцином последовательности и один или несколько структурных мотивов, характерных для иммуноглобулинов (Ig-подобные домены; см. с. 203). В геноме человека закодировано много других рецепторов данного типа, и каждый из них имеет собственный внеклеточный домен.

Инсулиновый рецептор — прототип целого ряда рецепторных ферментов с похожей структурой и активностью рецепторной тирозинкиназы (рис. 12-17). Например, рецепторы эпидермального фактора роста и фактора роста, производимого тромбоцитами, имеют сходство в структуре и аминокислотной последовательности с инсулиновым рецептором, и оба обладают активностью протеинтирозинкиназы, которая фосфорилирует IRS-1. Многие из этих рецепторов димеризуются после связывания лиганда, а инсулиновый рецептор представляет собой димер до присоединения инсулина. Связывание адаптерных белков, таких как Grb2, с остатками P-Tyr — общий механизм для облегчения белок-белковых взаимодействий. К рассмотрению этого механизма мы вернемся в разд. 12.5.

Что стимулировало эволюцию такого сложного регуляторного механизма? Эта система позволяет одному активированному рецептору активировать несколько молекул IRS-1, усиливая инсулиновый сигнал, что обеспечивает интеграцию сигналов от нескольких рецепторов, каждый может фосфорилировать IRS-1. Более того, поскольку IRS-1 может активировать любой из белков, которые содержат SH2-домены, один рецептор, действующий через IRS-1, может инициировать два (или более) сигнальных пути. Так, инсулин влияет на экспрессию генов через каскад Grb2–Sos–Ras–MAPK и на метаболизм гликогена — через каскад PI-3K–PKB. Наконец, существует несколько близкородственных белков IRS (IRS-1, IRS-2), каждый из которых характерным образом распределен в тканях и выполняет особые функции, что дополнительно расширяет возможности сигнальных путей, инициируемых протеинтирозинкиназами.

Сигнальная система JAK-STAT также использует тирозинкиназную активность

Рецепторные тирозинкиназы не обладают собственной протеинкиназной активностью, но приобретают ее после присоединения своих лигандов в цитозоле. Один из примеров — система, которая регулирует образование эритроцитов у млекопитающих. Цитокином (сигнальным веществом, важным для развития организма) для этой системы является эритропоэтин (EPO) — состоящий из 165 аминокислот белок, производимый почками. Когда EPO связывается со своим рецептором на плазматической мембране (рис. 12-18), рецептор димеризуется и становится способным присоединять растворимую протеинкиназу JAK (англ. *Janus kinase*). Это связывание активирует JAK, которая фосфорилирует несколько остатков Tyr в цитоплазматическом домене рецептора EPO. Семейство факторов транскрипции STAT (от англ. *signal transducers and activators of transcription*) также является мишенями активности JAK. SH2-домен в STAT5 связывается с остатками P-Tyr в рецепторе EPO, переводя их в конформацию, удобную для фосфорилирования протеинкиназой (JAK). Когда STAT5 фосфорилируется в ответ на действие EPO, он образует димеры, способные проникать в ядро. Здесь STAT5 вы-

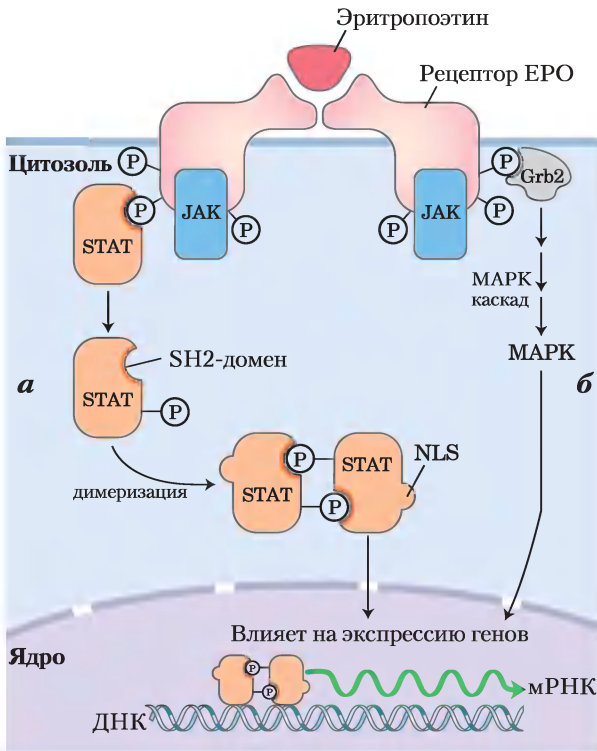


Рис. 12-18. Механизм передачи сигнала JAK–STAT на рецептор эритропоэтина. Связывание эритропоэтина (EPO) вызывает димеризацию рецептора EPO, что позволяет растворимой тирозинкиназе JAK присоединиться к внутреннему домену рецептора и фосфорилировать его по нескольким остаткам Тир. *а*) По одному сигнальному пути SH2-домен белка STAT5 связывается на рецепторе с остатками P-Tyr , что приводит к сближению рецептора и JAK. Фосфорилирование STAT5 JAK-киназой позволяет двум молекулам STAT образовать димер, при этом каждая молекула связывает разные остатки P-Tyr . Димеризация STAT5 экспонирует последовательность NLS (от англ. *nuclear localization sequence*), которая обеспечивает транспорт STAT5 в ядро. В ядре STAT вызывает экспрессию генов, контролируемых EPO. *б*) Второй сигнальный путь запускается аутофосфорилированием JAK, которая присоединяется к EPO, связанному с рецептором. Адаптерный белок Grb2 связывает P-Tyr в JAK и запускает каскад MAPK, как в инсулиновой системе (см. рис. 12-15).

зывает экспрессию (транскрипцию) генов, необходимых для созревания эритроцитов. Система JAK–STAT работает в нескольких сигнальных путях, включая путь гормона лептина, детально описанный в гл. 23 (рис. 23-37). Активированная JAK может также при участии Grb2 запускать каскад MAPK (рис. 12-18, *б*), который приводит к изменению экспрессии специфических генов.

Белок Src — еще одна растворимая протеинтирозинкиназа, которая связывается с некоторыми рецепторами, когда они присоединяют лиганды. В белке Src впервые был обнаружен характерный P-Tyr -связывающий домен, который впоследствии получил название «SH2-домен».

Сигнальные системы связаны между собой сложным образом

Для простоты мы рассматривали отдельные пути передачи сигналов как независимые последовательности событий, приводящих к отдельным метаболическим последствиям. Однако на самом деле между сигнальными системами существует тесная взаимосвязь. Система регуляции метаболизма сложно переплетена и многослойна. Мы отдельно обсуждали пути передачи сигнала от инсулина и адреналина, но они не являются независимыми. Во многих тканях действие инсулина противоположно действию адреналина, а активация инсулинового сигнального пути ослабляет передачу сигнала по β -адренергическому пути. Например, тирозинкиназа инсулинового рецептора напрямую фосфорилирует два остатка Тир в цитоплазматическом домене β_2 -адренергического рецептора, а активированный инсулином РКВ (рис. 12-19) фосфорилирует два остатка Ser в той же области. Фосфорилирование этих четырех остатков приводит к интернализации β_2 -адренергического рецептора, в результате чего он «выходит из строя», а клетка становится менее чувствительной к адреналину. Другой тип связи между этими рецепторами проявляется, когда остатки P-Tyr в β_2 -адренергическом рецепторе, фосфорилированные на инсулиновом рецепторе, служат местом присоединения содержащих SH2-домен белков, таких как Grb2 (рис. 12-19, *слева*). Активация инсулином фермента ERK в MAPK-каскаде (см. рис. 12-15) происходит в 5–10 раз активнее в присутствии β_2 -адренергического рецептора, возможно, благодаря существованию этой взаимосвязи. Системы передачи сигнала, использующие cAMP и Ca^{2+} , также взаимозависимы: каждый вторичный мессенджер влияет на образование и концентрацию другого. Одна из основных задач системной биологии состоит в сортировке результатов таких взаимодействий в метаболизме всех тканей организма — прямо скажем, задача не из легких!

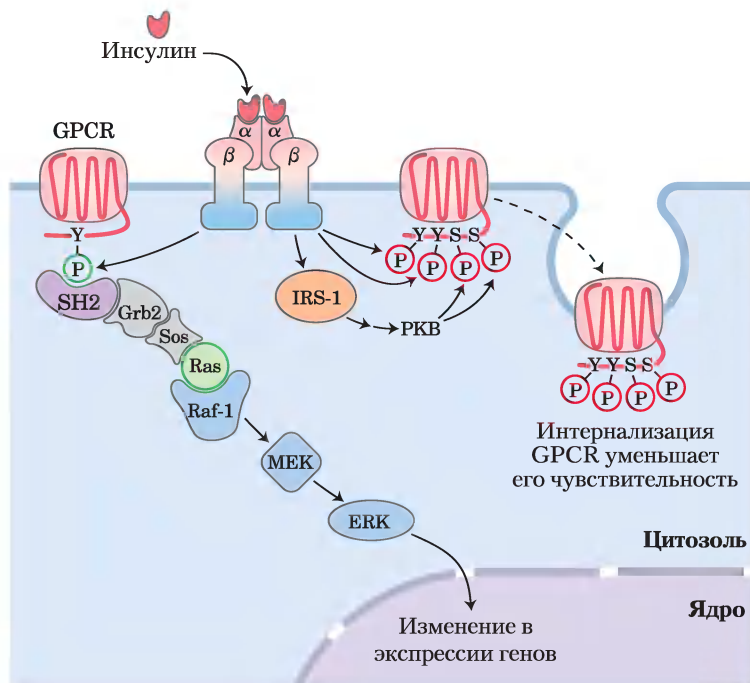


Рис. 12-19. Взаимодействие между инсулиновым рецептором и β_2 -адренергическим рецептором (или другим GPCR). При активации INS-R в результате связывания инсулина его тирозинкиназа напрямую фосфорилирует β_2 -адренергический рецептор (справа) по двум остаткам тирозина (Tyr³⁵⁰ и Tyr³⁶⁴) вблизи С-конца и, кроме того, путем активации протеинкиназы В (PKB; см. рис. 12-16) вызывает там же фосфорилирование двух остатков Ser. В результате такого фосфорилирования происходит интернализация адренергического рецептора, ослабляющая ответ на адреналин. В то же время катализируемое инсулиновым рецептором фосфорилирование GPCR (это может быть адренергический или другой рецептор) по С-концевым остаткам Tyr (слева) создает условия для активации MAPK-каскада (см. рис. 12-15); роль адаптерного белка при этом исполняет Grb2. В данном случае INS-R использует GPCR для усиления проведения собственного сигнала.

Краткое содержание раздела 12.3 РЕЦЕПТОРНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

- Инсулиновый рецептор (INS-R) — пример рецепторных ферментов с тирозинкиназной активностью. Когда инсулин связывается с рецептором, каждый $\alpha\beta$ -димер рецептора фосфорилирует β -цепь его партнера, активируя тирозинкиназную активность рецептора. INS-R катализирует фосфорилирование остатков Tyr в других белках, таких как IRS-1.
- Фосфорилированные остатки IRS-1 служат центрами связывания для белков с SH2-доменами. Некоторые из этих белков, такие как Grb2, имеют два (или более) связываю-

щих белки домена и могут служить адаптерами, сближающими два белка.

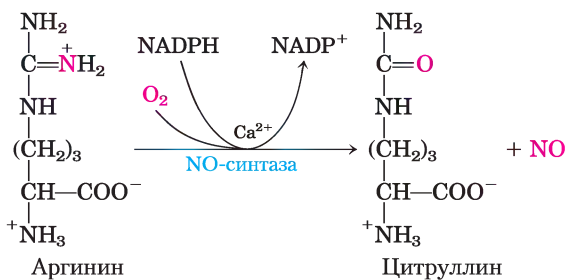
- Sos связывается с Grb2 и катализирует обмен GDP на GTP на белке Ras (малый G-белок), который в свою очередь активирует протеинкиназный каскад, заканчивающийся фосфорилированием белков-мишеней в цитозоле или ядре. В результате происходят специфические изменения метаболизма и экспрессии генов.
- Фермент PI-3K, активированный в результате взаимодействия с субстратом IRS-1, превращает мембранный липид PIP₂ в PIP₃, который становится местом сборки белковых комплексов для второй и третьей ветвей инсулинового сигнального пути.

тии, так и в работе взрослого мозга. Гуанилатциклаза в почках активируется гормоном **атриальным натрийуретическим пептидом, или фактором (ANF, от англ. atrial natriuretic factor)**, который высвобождается в предсердии, когда объем сердца увеличивается при притоке крови. Переносимый кровью в почки, ANF активирует гуанилатциклазу в клетках собирательных трубочек (рис. 12-20, а). В результате увеличивается концентрация сGMP, что стимулирует усиленное выведение почками Na^+ и, следовательно, воды, обусловленное изменением осмотического давления. Потеря воды уменьшает объем крови, противодействуя стимулу, который вначале привел к секреции ANF. В гладкой мускулатуре сосудов также расположена ANF-рецепторная гуанилатциклаза; при связывании со своим рецептором ANF вызывает расслабление мышц (вазодилатацию) кровеносного сосуда, что увеличивает ток крови при уменьшении кровяного давления.

Похожая рецепторная гуанилатциклаза в плазматической мембране клеток эпителия кишечника активируется кишечным пептидом **гуанилином** (рис. 12-20, а), который регулирует секрецию Cl^- в кишечнике. Этот рецептор является также мишенью устойчивого к нагреванию пептидного эндотоксина, вырабатываемого *Escherichia coli* и другими грамотрицательными бактериями. Увеличение концентрации сGMP, вызванное действием эндотоксина, увеличивает секрецию Cl^- и, как следствие, уменьшает всасывание воды кишечным эпителием, что приводит к диарее.

Принципиально другим типом гуанилатциклазы является цитозольный белок, содержащий прочно связанную гемовую группу (рис. 12-10, б). Этот белок активируется монооксидом азота (NO). Монооксид азота производится из аргинина Ca^{2+} -зависимой **NO-синтазой**, присутствующей в тканях млекопитающих, и диффундирует из клетки-источника в соседние клетки.

Молекула NO сравнительно слабо поляризована, поэтому она может проникать через плаз-

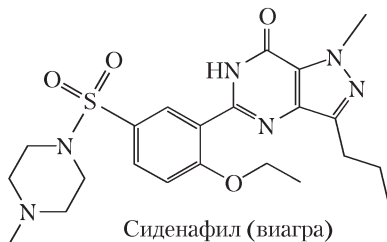


матическую мембрану без помощи переносчика. В клетках-мишенях NO связывается с гемовой группой гуанилатциклазы и стимулирует образование сGMP. В сердце сGMP снижает силу сокращений путем стимуляции ионных насосов, удаляющих Ca^{2+} из цитозоля.



Вызванная NO релаксация сердечной мышцы и есть тот самый ответ, который наблюдается при приеме таблеток нитроглицерина или других вазодилататоров для снятия боли при **стенокардии**, когда из-за заблокированных коронарных артерий сердечные сокращения происходят при недостатке кислорода. Монооксид азота нестабилен, и его действие кратковременно: за несколько секунд он окисляется до нитрита или нитрата. Вазодилататоры вызывают длительную релаксацию сердечной мышцы, так как они разлагаются в течение нескольких часов, обеспечивая постоянное поступление NO. Значение нитроглицерина как средства лечения стенокардии было обнаружено в 1860-х гг. по случайности на предприятиях, производящих нитроглицерин, который тогда использовали только в качестве взрывчатки. Рабочие, страдающие стенокардией, сообщали, что их состояние существенно улучшалось во время рабочей недели, а в выходные дни болезнь возвращалась. Врачи, лечившие этих рабочих, слышали эту историю так часто, что стали искать причинно-следственные связи, — так появилось лекарство.

Эффекты, связанные с усиленным синтезом сGMP, уменьшаются после прекращения действия стимула, так как специфическая фосфодиэстераза (сGMP PDE) превращает сGMP в неактивный 5'-GMP. У человека существует несколько изоформ сGMP PDE с разным распределением по тканям. В кровеносных сосудах пениса присутствует изоформа, которая ингибируется силденафилом (виагра), таким образом после однократного действия стимула поддерживается повышенный уровень сGMP. На этом основано лекарство для лечения нарушений эрекции. ■



Циклический GMP имеет и второй механизм действия в глазу позвоночных: он вызывает открытие ион-специфических каналов в колбочках и палочках сетчатки. Мы вернемся к этой роли cGMP при рассмотрении передачи зрительных сигналов в разд. 12.10.

Краткое содержание раздела 12.4 РЕЦЕПТОРНЫЕ ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ, cGMP И ПРОТЕИНКИНАЗА G

- Некоторые сигнальные вещества, в том числе атриальный натрийуретический фактор (пептид) и кишечный пептид гуанилин, действуют через рецепторный фермент, обладающий гуанилатциклазной активностью. Образовавшийся cGMP работает как вторичный мессенджер, активируя cGMP-зависимую протеинкиназу (PKG). Этот фермент изменяет метаболизм посредством фосфорилирования специфических белков-мишеней.
- Монооксид азота (NO) — мессенджер с коротким временем жизни, который действует, стимулируя растворимую гуанилатциклазу, при этом повышается концентрация cGMP и стимулируется PKG.

12.5. Мультивалентные адаптерные белки и мембранные рафты

Изучение сигнальных систем, таких, как были рассмотрены нами до сих пор, позволило сделать два обобщения: 1) протеинкиназы, фосфорилирующие остатки Tyr, Ser и Thr, играют ключевую роль в передаче сигнала; 2) обратимые белок-белковые взаимодействия, вызванные обратимым фосфорилированием остатков Tyr, Ser и Thr в сигнальных белках, создают возможность для их взаимодействия с другими белками. На самом деле многие сигнальные белки *мультивалентны* в том смысле, что они могут взаимодействовать с несколькими различными белками одновременно, образуя мультибелковые сигнальные комплексы. В этом разделе мы представим несколько примеров, иллюстрирующих общие принципы взаимодействий зависимых от фосфорилирования белков, задействованных в сигнальных путях.

Фосфорилированные остатки Tyr, Ser или Thr в белках-партнерах связаны в белковые модули

В инсулиновом сигнальном пути (рис. 12-15 и 12-19) белок Grb2 через свой SH2-домен образует связи с другими белками, которые содержат доступные остатки P-Tyr . Геном человека кодирует по крайней мере 87 SH2-содержащих белков, о многих из них известно, что они участвуют в передаче сигналов. Центр связывания остатка P-Tyr расположен в глубоком кармане SH2-домена, при этом все атомы кислорода фосфатной группы образуют водородные связи или участвуют в электростатических взаимодействиях, причем существенная роль в этих взаимодействиях принадлежит двум остаткам Arg, несущим положительные заряды. Едва заметные различия в строении SH2-доменов объясняют специфичность их взаимодействия с разными белками, содержащими P-Tyr . Специфичность взаимодействий с SH2-доменами обеспечивают всего 3–5 остатков P-Tyr на C-конце (рис. 12-21).

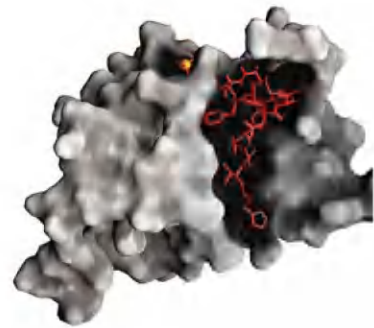


Рис. 12-21. Строение SH2-домена и его взаимодействие с остатком P-Tyr в белке-партнере (PDB ID 1SHC). Поверхность SH2-домена обведена серым контуром. Атом фосфора фосфатной группы в остатке P-Tyr обозначен оранжевым шариком. Следующие несколько остатков в направлении к C-концу белка-партнера выделены красным цветом. Если положение этого фосфорилированного остатка обозначить индексом 0, то следующие три остатка в направлении к C-концу — индексами +1, +2, +3. В некоторых SH2-доменах (Src, Fyn, Hck, Nck) преобладают взаимодействия с отрицательно заряженными остатками в положениях +1 и +2; в других активных центрах (PLC- γ 1, SHP-2) с протяженной гидрофобной полостью — алифатические остатки в положениях от +1 до +5. Этими различиями определяется специфичность SH2-доменов к разным партнерам.

Фосфотирозинсвязывающие домены (РТВ-домены — от англ. *phosphotyrosine-binding domains*) также могут образовывать связи с P-Tyr в белках-партнерах; по ключевым последовательностям и трехмерной структуре они отличаются от SH2-доменов. Геном человека кодирует 24 белка, содержащие РТВ-домены, в том числе IRS-1, который уже встречался нам в роли каркасного белка при изучении передачи РТВ-домена инсулинового сигнала (рис. 12-15). Остатки P-Tyr для связывания SH2-доменов и РТВ-доменов в белках-партнерах создаются тирозинкиназами и уничтожаются фосфопротеин-фосфатазами (РТРазами).

Другие сигнальные протеинкиназы, включая РКА, РКС, РКС, РКС и МАРК-каскад, фосфорилируют остатки Ser или Thr в белках-мишенях, и они в некоторых случаях приобретают способность образовывать связи через фосфорилированный остаток, тем самым запуская дальнейшие стадии передачи сигнала. Перечень доменов, связывающих остатки P-Ser или P-Thr , без сомнения, будет пополняться. Каждый домен взаимодействует только с определенной последовательностью, находящейся вблизи фосфорилированного остатка, так что с помощью семейства высокоспецифичных сайтов можно распознать целый набор фосфорилированных белков. Партнер, который связывается в домене, может находиться и в том же белке. Фосфорилирование некоторых протеинкиназ ингибирует их активность, благоприятствуя связыванию с P-Tyr с другим доменом того же фермента. Например, растворимая Тир-протеинкиназа Src фосфорилирована по ключевому остатку Tyr, она неактивна — в активном ферменте SH2-домен связывает субстрат, а не собственный P-Tyr (рис. 12-22, а). Киназа гликогенсинтазы 3 (GSK3) в неактивной форме фосфорилирована по остатку Ser в аутоингибиторном домене (рис. 12-22, б). При дефосфорилировании этого домена фермент может связывать и фосфорилировать белки-мишени.

Кроме трех часто фосфорилируемых аминокислотных остатков в сигнальных белках встречается четвертый структурный мотив, вокруг которого происходит формирование надмолекулярных комплексов, — фосфорилированная «головка» мембранных фосфатидилинозитов. Многие сигнальные белки содержат

домены, подобные доменам SH3 и PH (от англ. *plestrin homology domain*), которые прочно связываются с PIP_3 , выступающим из плазматической мембраны с внутренней стороны. В том участке мембраны, где фермент PI-3K создает эту «головку» (например, в ответ на инсулиновый сигнал), начинают скапливаться связывающиеся с ней белки.

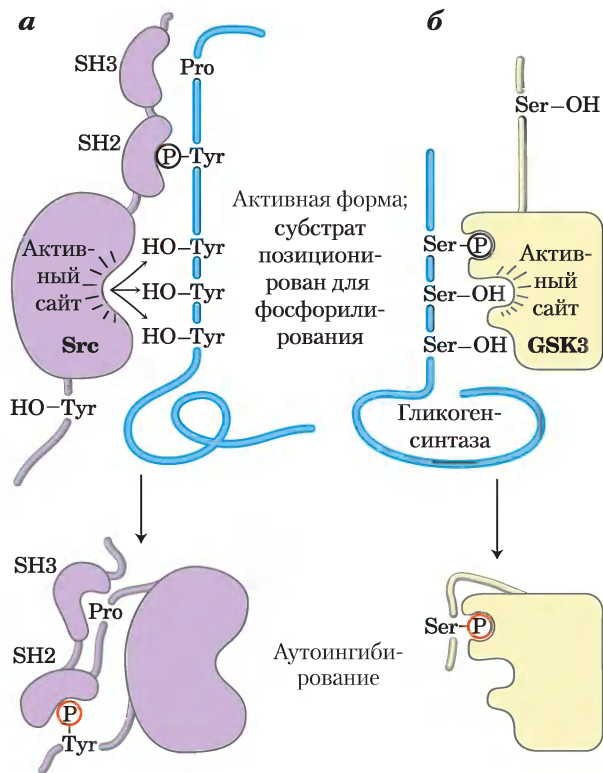


Рис. 12-22. Механизм аутоингибирования Src и GSK3.

а) Когда Тир-киназа Src находится в активной форме, ее SH2-домен связывает P-Tyr субстрата, а SH3-домен — богатую пролином область субстрата, сближая активный центр киназы с несколькими остатками Tyr в субстрате (вверху). Когда Src фосфорилируется по ключевому остатку Tyr (внизу), ее SH2-домен связывается с собственным P-Tyr вместо P-Tyr субстрата, препятствуя продуктивному связыванию киназы с субстратом; таким образом, фермент аутоингибируется. б) В активной форме киназы 3 гликогенсинтазы (GSK3) ее P-Ser -связывающий центр может образовывать связь с остатком P-Ser субстрата (гликогенсинтазы) и тем самым обеспечивает киназе позицию, нужную для фосфорилирования соседних остатков Ser (вверху). При фосфорилировании собственного остатка серина этот участок киназы занимает P-Ser -связывающий центр и препятствует связыванию субстрата (внизу).

Большинство белков в плазматической мембране, участвующих в передаче сигналов, содержат один или несколько белок- или фосфолипидсвязывающих доменов; многие имеют три или более таких домена и, таким образом, могут одновременно взаимодействовать с несколькими сигнальными белками. На **рис. 12-23** представлены лишь несколько из большого числа известных мультивалентных белков-участников процесса сигнализации. В состав многих комплексов входят белки со специальными доменами, которые отвечают за связывание с мембраной. Многие процессы передачи сигнала

происходят на внутренней стороне плазматической мембраны, поэтому естественно, что локализация молекул, которые должны столкнуться друг с другом для дальнейшей передачи сигнала, ограничена двумерным пространством — поверхностью мембраны. Вероятность столкновения в двумерном пространстве намного превосходит вероятность столкновения в трехмерном пространстве цитозоля.

Подводя итоги, можно сказать, что изучение многих сигнальных белков и их многочисленных доменов, ответственных за связывание с другими компонентами, привело к воссозданию удивитель-

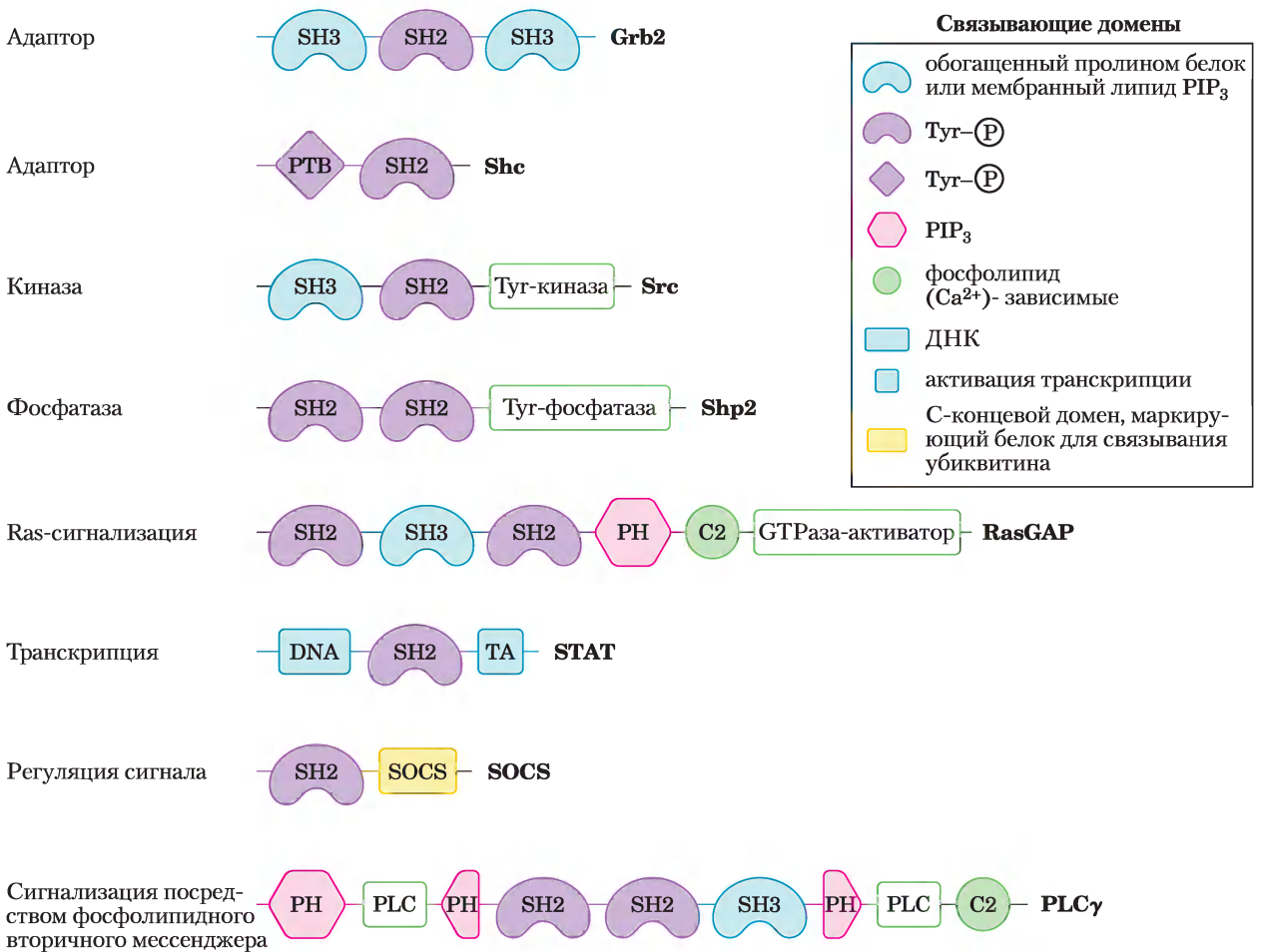


Рис. 12-23. Некоторые связывающие модули сигнальных белков. Каждый белок изображен в виде линейной цепи (N-конец слева). Локализация консервативных связывающих доменов показана символами. PH обозначает плекстриновую гомологию; другие сокращения см. в тексте; зелеными прямоугольниками показана каталитическая активность. Название каждого белка дается по С-концу. Эти сигнальные белки взаимодействуют с фосфорилированными белками или фосфолипидами в многих комбинациях, образуя интегральные сигнальные комплексы.

ной картины путей проведения сигналов в клетке. Первоначальный сигнал вызывает фосфорилирование рецептора или белка-мишени, приводя в действие совокупность больших мультибелковых комплексов, удерживаемых вместе на каркасах, которые формируются из адаптерных белков, имеющих мультивалентную связывающую способность. Некоторые из этих комплексов содержат несколько протеинкиназ, которые последовательно активируют друг друга, образуя каскад фосфорилирования и обеспечивая многократное усиление первоначального сигнала. Взаимодействие между протеинкиназами в каскаде происходит не в результате случайных столкновений в трехмерном пространстве. Например, в случае MAPK-каскада для связывания всех трех протеинкиназ (MAPK, MAPKK и MAPKKK) служит целое семейство адаптерных белков, которые обеспечивают их близкое расположение, правильную ориентацию и, кроме того, придают взаимодействию протеинкиназ аллостерический характер, в результате чего их последовательное фосфорилирование происходит даже при очень слабых стимулах.

Фосфотирозинфосфатазы (РТФазы) удаляют фосфат из остатков P-Tyr , снимая эффект фосфорилирования. Некоторые из этих фосфатаз являются рецептороподобными мембранными белками, которые, по всей вероятности, регулируются пока еще не идентифицированными внеклеточными факторами; другие РТФазы растворимы и содержат SH2-домены. Кроме того, клетки животных содержат протеинфосфосерин- и протеинфосфотreonинфосфатазы, которые снимают эффекты Ser- и Thr-специфичных протеинкиназ. Передача сигналов происходит в *белковых цепях*, эффективно создающихся сигнальным рецептором в ответ на действие эффектора и способных моментально выключаться посредством гидролиза одной фосфоэфирной связи.

Мультивалентность сигнальных белков делает возможным образование ансамблей из большого числа разнообразных комбинаций сигнальных модулей, каждая комбинация, по-видимому, соответствует определенным сигналам, типам клеток и метаболическим состояниям. Множество протеинкиназ и фосфопроteinсвязывающих доменов, каждый с собственной специфичностью (необходимая консенсусная последовательность в субстрате), образуют много комбинаций и множество сигнальных контуров исключительной сложности.

Мембранные рафты и кавеолы могут обособлять сигнальные белки

Мембранные рафты (с. 543) — это области мембранного бислоя, обогащенные сфинголипидами, стеринами и некоторыми белками; многие связаны с бислоем посредством GPI-якорей. β -Адренергический рецептор перемещается в рафты, содержащие G-белки, аденилатциклазу, РКА и специфическую протеинфосфатазу PP2, которые вместе образуют высокоинтегрированную сигнальную единицу. Изоляция в небольшом участке плазматической мембраны всех элементов, необходимых для начала и завершения ответа на сигнал, позволяет клетке быстро увеличивать концентрацию вторичного мессенджера в строго ограниченном пространстве.

По-видимому, некоторые рецепторные тирозинкиназы (EGF-R и PDGF-R) локализуются в рафтах, и подобная изоляция, скорее всего, имеет функциональное значение. Когда холестерин удаляется из рафтов путем обработки циклодекстрином (связывает холестерин и удаляет его из мембран), рафты разрушаются, а некоторые сигнальные пути оказываются поврежденными.

Если рецепторная тирозинкиназа в рафте фосфорилируется, а фосфотирозинфосфатаза, которая снимает это фосфорилирование, находится в другом рафте, то дефосфорилирование Tyr-киназы будет заторможено или полностью предотвращено. Возможно, взаимодействия между адаптерными белками, достаточно сильны для того, чтобы втянуть в рафт сигнальный белок или чтобы вытолкнуть рецепторы из рафта. Например, рецепторы EGF в изолированных фибробластах обычно концентрируются в особых рафтах, называемых кавеолами (рис. 11-21), но если их обработать EGF, то рецепторы покидают рафт. Эта миграция зависит от активности рецепторной протеинкиназы; мутантные рецепторы, лишённые этой активности, при обработке EGF остаются в рафте. Кавеолин — интегральный мембранный белок, локализованный в кавеоле, — фосфорилируется по остатку Tyr в ответ на действие инсулина и после фосфорилирования может позволить активированному теперь рецептору EGF втянуть своих партнеров по связыванию в рафт. Обособление сигнальных белков в рафтах добавляет еще одно «измерение» к уже достаточно сложным процессам, инициируемым внеклеточными сигналами.

ли соответствующий рецептор путем связывания со специфическим лигандом (например, нейромедиатором) или изменением трансмембранного электрического потенциала V_m .

Na^+/K^+ -АТРаза создает дисбаланс заряда на плазматической мембране, выбрасывая 3Na^+ из клетки на каждые 2K^+ , переносимые внутрь (рис. 12-24, а); благодаря этому внутренняя сторона отрицательно заряжена по отношению к внешней. Говорят, что мембрана поляризована.

КЛЮЧЕВЫЕ ДОГОВОРЕННОСТИ. Мембранный потенциал V_m отрицательный, когда заряд внутри клетки отрицательный относительно заряда снаружи. Для типичной животной клетки V_m составляет от -60 до -70 мВ. ■

Поскольку ионные каналы обычно пропускают либо анионы, либо катионы, но не оба типа ионов, ионный поток через канал вызывает перераспределение заряда по обе стороны мембраны, изменяя V_m . Вход положительно заряженных ионов (например, Na^+) или выход отрицательно заряженных (Cl^-) *деполяризуют* мембрану, $V_m \rightarrow 0$. Выход K^+ *гиперполяризует* мембрану, и V_m становится более отрицательным. Эти ионные потоки через каналы осуществляются по механизму пассивного транспорта в противоположность активному транспорту с помощью Na^+/K^+ -АТРаза.

Направление спонтанного потока ионов через поляризованную мембрану определяется электрохимическим потенциалом этого иона на мембране, который складывается из двух компонентов: разности концентраций (C) данного иона с двух сторон мембраны и разности электрического потенциала (обычно выражается в милливольтгах). Энергия (ΔG), которая вызывает спонтанный перенос катиона (скажем, Na^+) по ионному каналу внутрь клетки, является функцией отношения концентраций иона на

двух сторонах мембраны ($C_{\text{внутри}}/C_{\text{снаружи}}$) и разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$ или V_m):

$$\Delta G = RT \ln (C_{\text{внутри}}/C_{\text{снаружи}}) + Z F V_m \quad (12-1)$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — абсолютная температура, Z — заряд иона и F — константа Фарадея. В уравнении 12-1 знак заряда иона определяет знак перед вторым слагаемым. В типичном нейроне или миоците концентрации Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Cl^- в цитозоле очень отличаются от их концентраций в межклеточной жидкости (табл. 12-6). Для приведенных концентраций и потенциала покоя -60 мВ, используя уравнение 12-1, получим, что открытие Na^+ - или Ca^{2+} -канала приведет к спонтанному выходу K^+ (и гиперполяризации мембраны) (рис. 12-24, б).

Эти ионы продолжают двигаться через канал только до тех пор, пока комбинация градиента концентрации и градиента электрического потенциала обеспечивает движущую силу, согласно уравнению 12-1. Например, транспорт ионов Na^+ по градиенту концентрации деполяризует мембрану. При $V_m = +70$ мВ действие мембранного потенциала (сопротивление дальнейшему входу Na^+) в точности уравновесит действие градиента концентрации (поток Na^+ внутрь). При этом равновесном потенциале (E) движущая сила $\Delta G = 0$. Для каждого иона характерен свой равновесный потенциал, поскольку концентрации ионов по обе стороны мембраны различаются.

Количество ионов, которые должны транспортироваться, чтобы заметно изменить мембранный потенциал, пренебрежимо мало по сравнению с концентрациями Na^+ , K^+ и Cl^- в клетках и межклеточной жидкости, так что ионные потоки, которые возникают при передаче сигнала в возбудимых клетках, не оказывают существенного влияния на концентрацию этих ионов. Однако, поскольку внутриклеточная концентрация Ca^{2+} обычно очень мала ($\sim 10^{-7}$ М), вход Ca^{2+} в клетку

Таблица 12-6 Концентрации ионов (мМ) в клетках и межклеточных жидкостях

Тип клеток	K^+		Na^+		Ca^{2+}		Cl^-	
	Внутри	Снаружи	Внутри	Снаружи	Внутри	Снаружи	Внутри	Снаружи
Аксон кальмара	400	20	50	440	$\leq 0,4$	10	40–150	560
Мышца лягушки	124	2,3	10,4	109	$< 0,1$	2,1	1,5	78

может значительно изменить концентрацию ионов кальция в цитозоле.

Мембранный потенциал клетки зависит от того, сколько ионных каналов какого типа открыто в этот момент. В большинстве клеток в состоянии покоя открыто больше K^+ -каналов, чем Na^+ -, Cl^- - или Ca^{2+} -каналов, и поэтому потенциал покоя ближе к E для K^+ (-98 мВ), чем для любого другого иона. Когда открыты каналы для иона Na^+ , Cl^- или Ca^{2+} , мембранный потенциал стремится к E для этих ионов. Регулируемое по времени открывание и закрывание ионных каналов и обусловленные этим кратковременные изменения мембранного потенциала лежат в основе электрической сигнализации, посредством которой нервная система стимулирует сокращение скелетных мышц, биение сердца или заставляет секреторные клетки высвобождать их сигнальные вещества. Более того, многие гормоны оказывают действие, изменяя мембранные потенциалы в клетках-мишенях. Эти механизмы не ограничиваются организмами животных; ионные каналы играют важную роль в ответах на сигналы от окружающей среды у бактерий, простейших и растений.

Чтобы проиллюстрировать действие ионных каналов при передаче сигнала от клетки к клетке, опишем механизмы, посредством которых нейрон проводит импульс по всей своей длине и через синапс к следующему нейрону (миоциту) в цепочке клеток, используя ацетилхолин в качестве нейромедиатора.

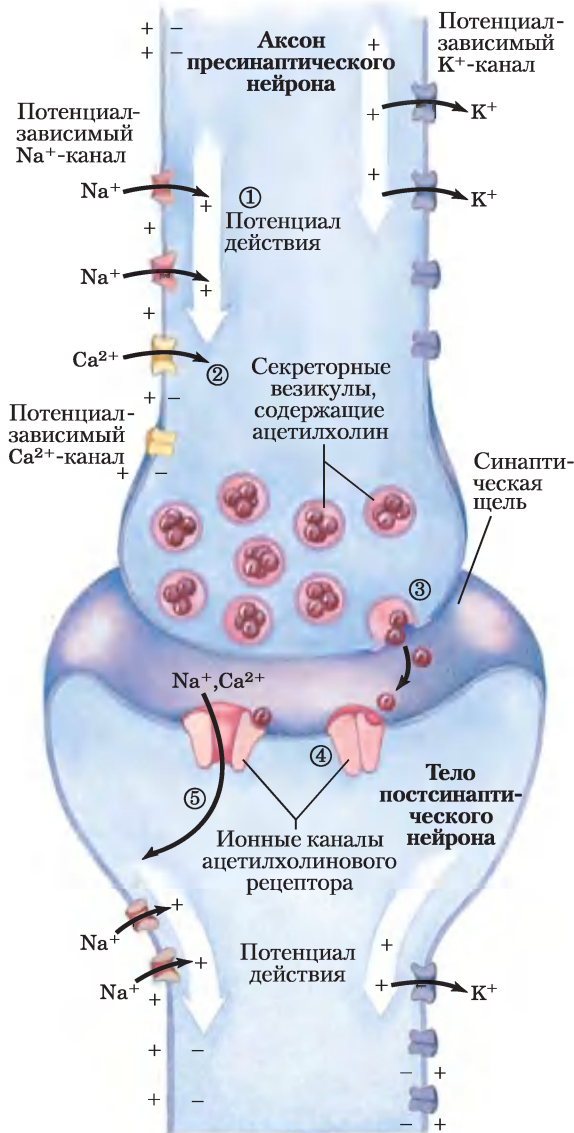
Потенциалзависимые ионные каналы создают потенциалы действия в нейронах

В нервной системе передача сигналов совершается по сети нейронов — специализированных клеток, проводящих электрический импульс (потенциал действия) с конца клетки (тело клетки) через удлиненный отросток (аксон). Электрический сигнал запускает высвобождение молекул нейромедиатора в синапсе, передавая сигнал следующей клетке цепи. Для этого механизма передачи сигналов необходимы три типа **потенциалзависимых ионных каналов**. По всей длине аксона находятся **потенциалзависимые Na^+ -каналы (рис. 12-25)**, которые закрыты, когда мембрана находится в состоянии покоя ($V_m = -60$ мВ), но открываются на короткое время, когда мембрана локально де-

поляризуется в ответ на действие ацетилхолина (или какого-то другого нейромедиатора). Вдоль аксона также находятся **потенциалзависимые K^+ -каналы**, которые открываются чуть позже, чем Na^+ -каналы, в ответ на деполяризацию, индуцированную открыванием Na^+ -каналов. Таким образом, проходящий по аксону поток ионов натрия, вызывающих деполяризацию (ионы входят в клетку), быстро сменяется реполяризующим выходом ионов калия. На удаленном (дистальном) конце аксона находятся **потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы**. Когда волны деполяризации и реполяризации, вызванные действием Na^+ - и K^+ -каналов, достигают Ca^{2+} -каналов, они открываются, ионы Ca^{2+} из межклеточного пространства поступают в клетку и запускают высвобождение нейромедиатора ацетилхолина, который передает сигнал следующей нервной клетке (запустить потенциал действия!) или мышце (сократиться!).

Потенциалзависимые Na^+ -каналы очень избирательны по отношению к ионам натрия по сравнению с другими катионами (в 100 раз или более) и обеспечивают очень высокую скорость потока ($>10^7$ ионов Na^+ /с). После открывания при активации Na^+ -каналы очень быстро подвергаются инактивации из-за снижения мембранного потенциала — каналы закрываются через несколько миллисекунд и остаются неактивными многие миллисекунды. Так как K^+ -каналы открываются в ответ на деполяризацию, вызванную открыванием Na^+ -каналов, итоговый выход ионов K^+ реполяризует мембрану локально. По аксону проходит волна деполяризации по мере того, как деполяризация в отдельных участках запускает волну открывания близлежащих сначала Na^+ -, а затем K^+ -каналов (рис. 12-25). За открыванием каждого Na^+ -канала следует короткий период рефрактерности, в течение которого канал не может открыться вновь; это обеспечивает односторонность волны деполяризации — потенциала действия — от тела нейрона к концу аксона (стадия ① на рис. 12-25).

Когда волна деполяризации достигает потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов, они открываются (стадия ②), и ионы кальция входят в клетку из межклеточного пространства. Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме приводит к высвобождению ацетилхолина экзоцитозом в синаптическую щель (стадия ③). Ацетилхолин диффундирует в постсинаптическую клетку



(другой нейрон или миоцит), где связывается с рецептором и запускает деполяризацию. Так сигнал проходит в следующую клетку нейронной цепи. Итак, регулируемые ионные каналы передают сигналы одним из двух способов: изменяя цитозольную концентрацию иона (например, Ca^{2+}), который затем работает как вторичный мессенджер (первичный мессенджер — это гормон или нейромедиатор), или изменяя V_m и влияя на другие мембранные белки, которые чувствительны к V_m . При передаче электрического сигнала от одного нейрона следующему задействованы оба механизма.

Рис. 12-25. Роль потенциалзависимых и химически регулируемых ионных каналов в передаче нервных импульсов. Первоначально плазматическая мембрана пресинаптического нейрона поляризуется (отрицательный заряд внутри) посредством действия электрогенной Na^+/K^+ -АТФазы, которая выкачивает три иона Na^+ наружу на каждые 2 иона K^+ , закачиваемые в нейрон (см. рис. 12-24). ① Стимул, действующий на этот нейрон, вызывает волну потенциала действия вдоль аксона (белая стрелка) по направлению от тела клетки. Открывание одного потенциалзависимого Na^+ -канала делает возможным вход Na^+ ; возникающая в результате этого локальная деполяризация вызывает открывание соседнего Na^+ -канала и т. д. Направленность волны потенциала действия обеспечивается коротким периодом рефрактерности, который следует за открыванием каждого потенциалзависимого Na^+ -канала. ② Когда волна деполяризации достигает конца аксона, открываются потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы, делая возможным вход Ca^{2+} в пресинаптический нейрон. ③ В результате этого концентрация внутриклеточного Ca^{2+} увеличивается, что запускает высвобождение (путем экзоцитоза) нейромедиатора ацетилхолина в синаптическую щель. ④ Ацетилхолин связывается с рецептором на постсинаптическом нейроне, вызывая открытие регулируемого ацетилхолином ионного канала. ⑤ Внеклеточные Na^+ и Ca^{2+} входят через этот канал, деполяризуя постсинаптическую клетку. Таким образом, электрический сигнал проходит к телу постсинаптического нейрона и перемещается вдоль аксона к третьему нейрону, при соблюдении той же последовательности событий.

В разд. 11.3 мы достаточно подробно обсудили строение и механизм действия потенциалзависимого калиевого канала (см. рис. 11-48, 11-49 и 11-50). Здесь остановимся подробнее на работе натриевых каналов. Основной элемент натриевого канала — большой полипептид (1840 аминокислотных остатков) из четырех доменов, организованных вокруг центрального канала (рис. 12-26, а, б), по которому ионы натрия проходят через мембрану. Специфичность канала к ионам натрия создается с помощью «поры», образованной участками между 5-й и 6-й трансмембранными спиралью каждого домена. В 4-й спирали каждого домена сосредоточено много положительно заряженных остатков Arg; считается, что этот участок перемещается в мембране при изменениях трансмембранного потенциала от -60 мВ (потенциал в состоянии покоя) до $+30$ мВ. При перемещении 4-й спирали канал открывается, на чем и основано его потенциалзависимое действие (рис. 12-26, в).

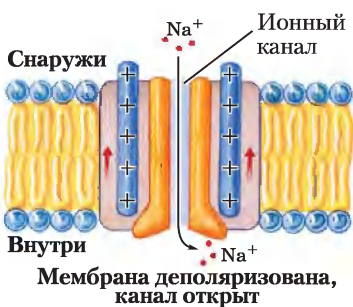
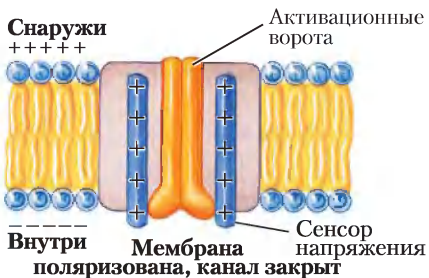
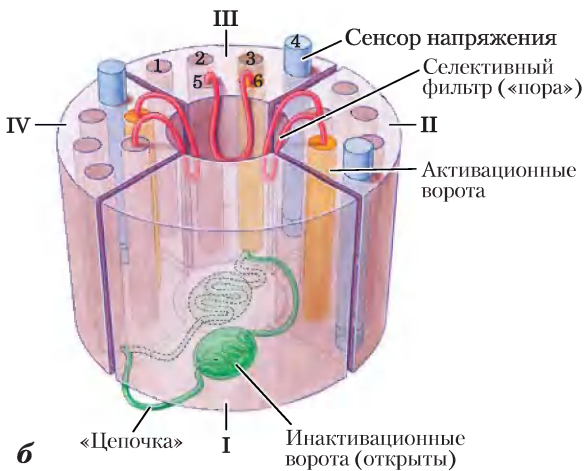
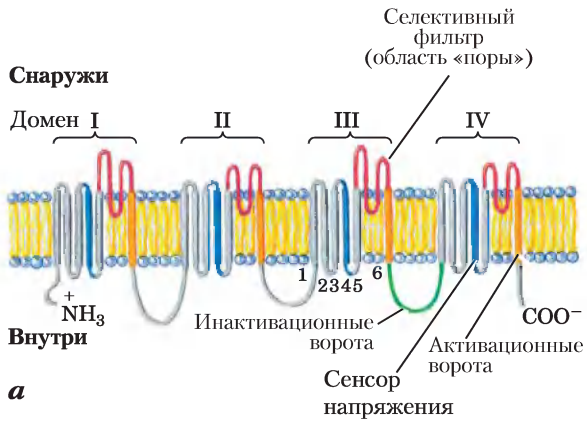
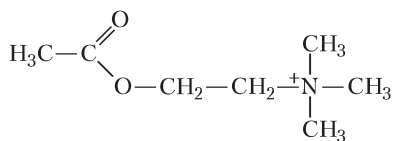
**в**

Рис. 12-26. Потенциалзависимые Na^+ -каналы нейронов. У разных организмов и в разных тканях натриевые каналы построены из разных субъединиц, но основную функцию выполняет главная α -субъединица. а) α -Субъединица — большая белковая молекула, состоящая из четырех гомологичных доменов (I–IV; здесь для большей наглядности они изображены отдельно друг от друга), каждый из которых содержит шесть трансмембранных спиралей (1–6). В каждом домене 4-я спираль (синяя) работает как сенсор напряжения, а 6-я спираль (оранжевая), по-видимому, образует активационные ворота. Пора (красный цвет), формируется петлей между 5-й и 6-й спиралью, это селективный фильтр. Между доменами III и IV (зеленый цвет) расположены инактивационные ворота. б) Четыре домена образуют центральную полость — трансмембранный канал, в который входят полярные аминокислотные остатки. На внешней стороне мембраны четыре поры (красные) соединены в селективный фильтр, одинаково устроенный во всех натриевых каналах. Фильтр обеспечивает канал способностью отличать ионы натрия от других ионов близкого размера. Инактивационные ворота (зеленый цвет) закрываются (пунктирная линия) вскоре после открывания активационных ворот. в) Действие сенсора напряжения основано на том, что при изменении трансмембранного потенциала 4-я спираль (синяя) принимает положение перпендикулярно плоскости мембраны. Как показано в верхней части рисунка, большой положительный заряд на 4-й спирали способствует тому, что при отрицательном потенциале (V_m) на внутренней стороне мембраны спираль оказывается втянутой в пору. При деполяризации эта сила ослабевает, так что 4-я спираль возвращается в релаксированное состояние (внизу). Это изменение сообщается на активационные ворота (оранжевый цвет), в результате чего происходят конформационные изменения, открывающие канал при деполяризации.

Инактивация канала, по-видимому, происходит по механизму «затычки на цепочке» (как в ванне). На цитоплазматической стороне натриевого канала находится белковый домен (инактивационных ворот, «затычка»), который привязан к каналу короткой полипептидной «цепочкой» (рис. 12-26, б). «Затычка» свободно болтается на «цепочке», когда канал закрыт, но когда канал открывается, внутри него высвобождается участок, с которым «затычка» связывается, перекрывая канал. Вероятно, длительность пребывания ионного канала в открытом состоянии определяется длиной «цепочки»: чем она длиннее, тем дольше канал открыт. По схожему механизму могут инактивироваться и другие регулируемые ионные каналы.

Ацетилхолиновый рецептор — это регулируемый лигандом ионный канал

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор участвует в передаче электрического сигнала в некоторых типах синапсов, а также в нервно-мышечных соединениях (между моторным нейроном и мышечным волокном), подавая мышцам сигнал к сокращению. (Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы и мускариновые ацетилхолиновые рецепторы отличали друг от друга по чувствительности первых к никотину, а вторых — к алкалоиду грибов мускарину. Эти рецепторы имеют разное строение и выполняют разные функции.) Ацетилхолин, высвобождаемый пресинаптическим нейроном или моторным нейроном, диффундирует на несколько микрометров к плазматической мембране постсинаптического нейрона или миоцита, где связывается с ацетилхолиновым рецептором. Это связывание вызывает изменение конформации молекулы рецептора, заставляя ионный канал открыться. Возникающий поток катионов в клетку деполяризует плазматическую мембрану. В мышечной ткани это приводит к сокращению мышечного волокна. Ацетилхолиновый рецептор позволяет проходить ионам Na^+ , Ca^{2+} и K^+ , но другие катионы и никакие анионы пройти не могут. Прохождение ионов натрия через ацетилхолиновый рецепторный канал является ненасыщаемым (это означает, что скорость потока ионов линейно зависит от внеклеточной концентрации Na^+), а скорость прохождения очень высока — около $2 \cdot 10^7$ ионов в секунду при физиологических условиях.



Ацетилхолин

Подобно другим регулируемым ионным каналам, ацетилхолиновый рецептор открывается в ответ на стимул, посылаемый сигнальной молекулой, и имеет свой механизм отсчета времени, закрывающий канал через несколько миллисекунд. Таким образом, ацетилхолиновый сигнал краткосрочный, что, как мы видели, представляет собой важное свойство механизма передачи электрического сигнала. Нам понятны структурные изменения, которые приводят к открытию ацетилхолино-

вого рецептора, однако не до конца изучен точный механизм «десенсibilизации», в результате которого вход в канал остается закрытым даже при продолжительном присутствии ацетилхолина.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор состоит из пяти субъединиц: одной β -, одной γ -, одной δ - и двух идентичных α -субъединиц, содержащих по участку связывания ацетилхолина. У всех пяти субъединиц сходная аминокислотная последовательность и третичная структура, во всех пяти по четыре трансмембранных спиральных участка (от M1 до M4) (рис. 12-27, а). Пять субъединиц располагаются по кругу, в центре которого пора, образованная их M2-спиралями (рис. 12-27, б, в). В тех участках канала, которые выступают за пределы цитоплазматической и клеточной поверхностей, просвет поры составляет 20 Å, но в пределах двойного липидного слоя она сужается. В середине двойного липидного слоя располагается кольцо объемных гидрофобных боковых цепей лейцина спиралей M2, что не позволяет ионам проходить через канал (рис. 12-27, г). Аллостерические изменения конформации, индуцированные присоединением ацетилхолина к двум α -субъединицам, сопровождаются небольшим поворотом спиралей M2, в результате чего эти гидрофобные остатки удаляются от поры канала, канал открывается для прохождения ионов.

Нейроны содержат рецепторные каналы, которые отвечают на действие различных нейромедиаторов

Клетки животных, особенно клетки нервной системы, содержат множество ионных каналов, потенциалзависимых и регулируемых химическими лигандами, или каналов, зависящих от потенциала и химических веществ одновременно. Нейромедиаторы 5-гидрокситриптамин (серотонин), глутамат и глицин могут действовать через рецепторные каналы, родственные по структуре рецептору ацетилхолина. Серотонин и глутамат индуцируют открытие катионных (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) каналов, а глицин открывает Cl^- -каналы. Катионные и анионные каналы различаются по аминокислотной последовательности (очень немного) вдоль гидрофильного канала. Катионные каналы содержат в ключевых позициях отрицательно заряженные боковые цепи Glu и Asp. Когда в эксперименте несколько этих кислых остатков за-

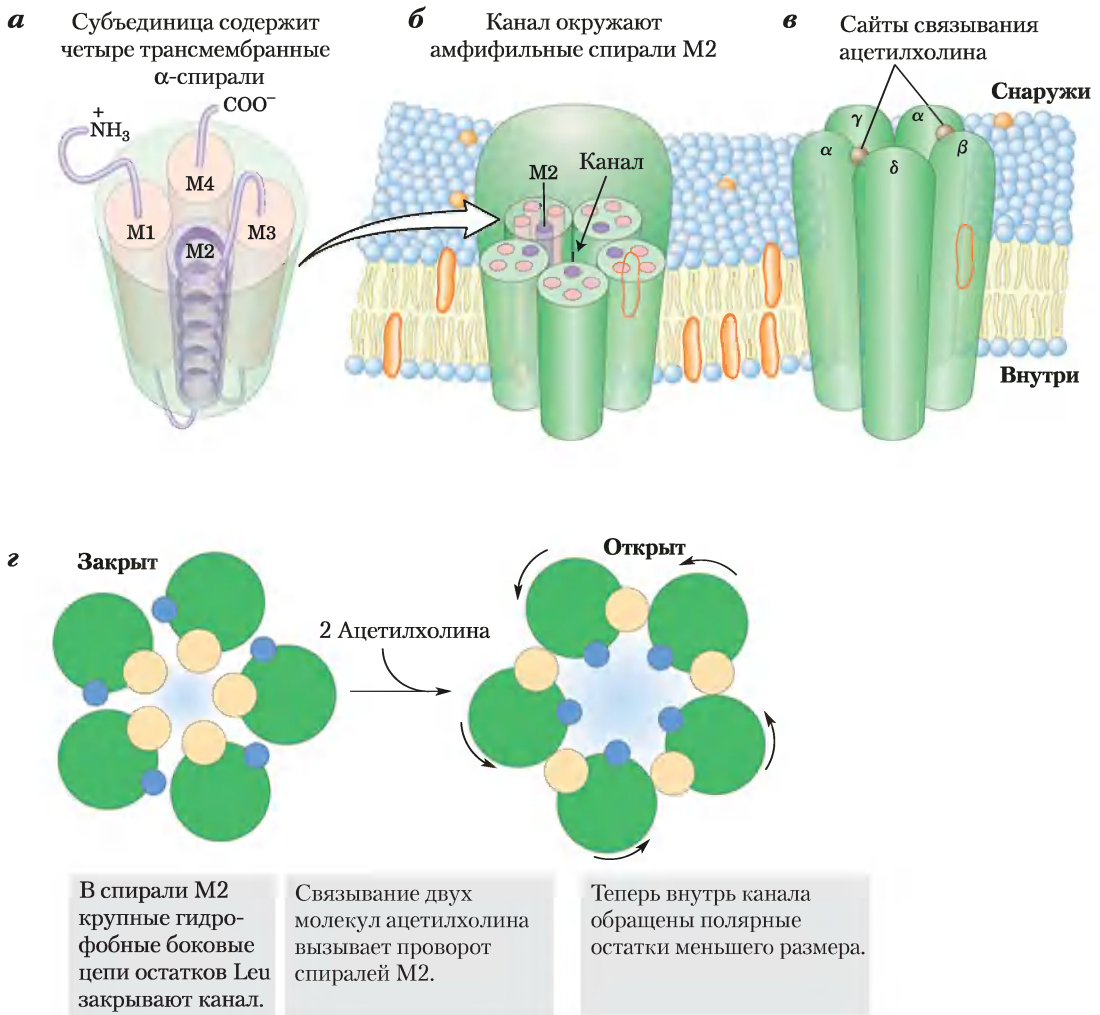
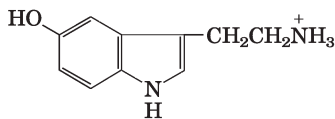
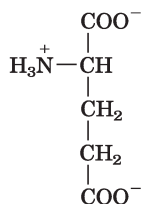


Рис. 12-27. Ацетилхолиновый ионный канал. а) Каждая из пяти гомологичных субъединиц ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) содержит четыре трансмембранные спирали (от M1 до M4). Спираль M2 амфифильна, другие спирали содержат в основном гидрофобные аминокислотные остатки. б) Пять субъединиц расположены по кругу, образуя в центре трансмембранный канал, «выстланный» полярными остатками спиралей M2. Сверху и снизу на входе в канал по окружности располагаются отрицательно заряженные аминокислотные остатки. в) Модель ацетилхолинового рецептора, построенная по данным электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа родственного белка (ацетилхолинсвязывающего белка моллюска). г) Поперечное сечение канала через внутреннюю часть спиралей M2: видны боковые цепи пяти остатков лейцина (желтые; по одному из каждой спирали M2), которые направлены внутрь канала, что делает канал слишком узким для прохождения ионов Ca^{2+} , Na^+ или K^+ . Когда оба центра связывания ацетилхолина (по одному на каждой α -субъединице) оказываются занятыми, происходят конформационные изменения. Спираль M2 слегка поворачивается, и пять остатков лейцина уходят из центра канала, а на их место встают полярные основания меньшего размера (синие). В результате канал открывается, давая проход ионам Ca^{2+} , Na^+ или K^+ .

мещали основными остатками, катионный канал превращался в анионный.



Серотонин
(5-гидрокситриптамин)



Глутамат

В зависимости от того, какой ион проходит через канал, лиганд (нейромедиатор) этого канала либо деполяризует, либо гиперполяризует клетку-мишень. Обычно нейрон принимает информацию от нескольких (многих) других нейронов, при этом каждый высвобождает характерный для него нейромедиатор со свойственным ему деполяризующим или гиперполяризующим эффектом. Таким образом, V_m клетки-мишени отражает *интегрированный* ввод информации от многих нейронов (рис. 12-1, з). Клетка отвечает возникновением потенциала действия, только если интегрированный ввод вызывает суммарную деполяризацию, т. е. V_m имеет достаточную для этого величину.

Рецепторные каналы для ацетилхолина, глицина, глутамата и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) управляются *внеклеточными* лигандами. *Внутриклеточные* вторичные мессенджеры, такие как cAMP, cGMP (3',5'-циклический GMP, близкий аналог cAMP), IP₃ (инозит-1,4,5-трифосфат), Ca²⁺ и АТР, регулируют ионные каналы другого типа, которые, как мы увидим в разд. 12.10, участвуют в передаче сигналов от органов чувств — зрительных, обонятельных и вкусовых.

Токсины отравляют ионные каналы

На ионные каналы действуют многие мощные природные токсины. Например, в разд. 11.3 мы упоминали о том, что дендротоксин (яд черной мамбы) блокирует потенциалзависимые калиевые каналы, тетродотоксин (образуемый иглобрюхом) действует на потенциалзависимые натриевые каналы, а кобротоксин нарушает работу ацетилхолиновых рецепторов. Почему в процессе эволюции сложилось так, что именно ионные каналы, а не какие-либо ключевые ферменты энер-

гетического обмена, стали излюбленной мишенью токсинов?

Ионные каналы представляют собой необычайно эффективные усилители. Через один канал проходит около 10 млн ионов в секунду. Это означает, что для передачи сигнала необходимо сравнительно небольшое количество белков ионных каналов на один нейрон. Поэтому сравнительно небольшое количество молекул токсина, обладающих высоким сродством к ионному каналу, способны оказать весьма сильное влияние на передачу нервного сигнала в организме. Для достижения подобного эффекта посредством влияния на метаболические ферменты, концентрация которых в клетке обычно гораздо выше, чем белков ионных каналов, понадобилось бы значительно больше токсина.

Краткое содержание раздела 12.6 РЕГУЛИРУЕМЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ

- Ионные каналы, управляемые мембранным потенциалом или химическими лигандами, — главные участники передачи сигналов в нейронах и других клетках.
- Потенциалзависимые Na⁺- и K⁺-каналы мембран нейронов проводят потенциал действия вдоль аксона в виде волны деполяризации (вход Na⁺), за которой следует реполяризация (выход K⁺).
- Открытие потенциалзависимых каналов происходит в результате того, что трансмембранный пептид, несущий на себе высокую плотность зарядов (остатки Arg или другие заряженные аминокислотные остатки), перемещается перпендикулярно плоскости мембраны.
- Когда потенциал действия доходит до дистального конца пресинаптического нейрона, он вызывает высвобождение нейромедиатора. Нейромедиатор (например, ацетилхолин) диффундирует к постсинаптическому нейрону (или к миоциту при нервно-мышечном сопряжении), связывается со специфическим рецептором на плазматической мембране и вызывает изменения V_m .

- Ацетилхолиновый рецептор нейронов и миоцитов — химически регулируемый ионный канал; связывание ацетилхолина приводит к конформационным изменениям, в результате которых канал становится доступным для прохождения ионов Na^+ и Ca^{2+} .
- Продуцируемые во многих организмах нейротоксины отравляют ионные каналы нервных клеток, поэтому эти токсины действуют быстро и смертельно опасны.

12.7. Интегрины: двунаправленные рецепторы, ответственные за клеточную адгезию

Интегрины представляют собой белки плазматической мембраны, отвечающие за прикрепление клеток друг к другу и к внеклеточному матриксу, а также передающие сигнал через мембрану в двух направлениях (рис. 12-28). В геноме млекопитающих обнаружены гены 18 α -субъединиц и восемь β -субъединиц, которые встречаются в разных тканях, в различных сочетаниях и обладают разной специфичностью к лигандам. По-видимому, каждый из 24 обнаруженных до сих пор интегринов выполняет свою функцию.

Интегрины информируют клетку о состоянии ее окружения и поэтому играют ведущую роль в процессах, связанных с селективными межклеточными взаимодействиями, такими как эмбриональное развитие, свертывание крови, иммунные реакции, а также рост и метастазирование опухолей. К внеклеточным лигандам интегринов относятся коллаген, фибриноген, фибронектин и многие другие белки, содержащие распознаваемую интегринными последовательность $-\text{Arg}-\text{Gly}-\text{Asp}-$ (RGD). Короткие цитоплазматические участки α - и β -субъединиц взаимодействуют с белками цитоскелета, расположенного прямо под плазматической мембраной (талином, α -актенином, винкулином, паксиллином и другими белками), модулируя сборку структур цитоскелета на основе молекул актина. Связь интегринов одновременно с внеклеточным матриксом и с цитоскелетом позволяет клетке собирать информацию о состоянии внеклеточной и внутриклеточной среды, а также координировать положение цитоскелета и внеклеточных участков адгезии. Благодаря этой способности интегрины определяют форму,

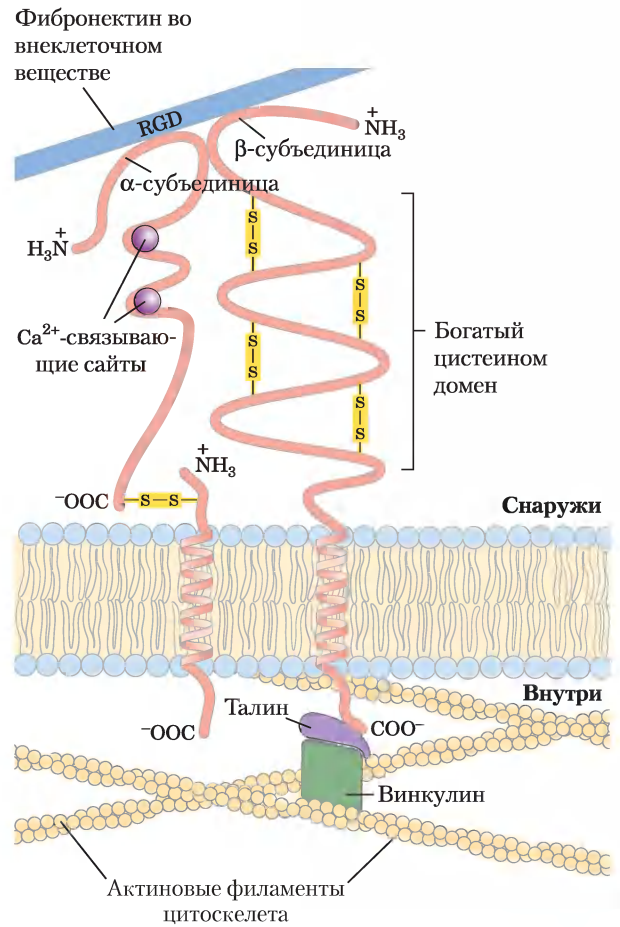


Рис. 12-28. Двунаправленная передача сигнала с помощью интегринов. Все интегрины имеют одну α - и одну β -субъединицу, причем каждая субъединица состоит из короткого цитоплазматического участка, одной трансмембранной спирали и большого внеклеточного домена, содержащего центр связывания лиганда. β -Субъединица содержит много остатков Cys и внутренних дисульфидных мостиков. α -Субъединица во многих интегринных комплексах имеет несколько центров связывания двухвалентных катионов, таких как катионы Ca^{2+} , необходимых для связывания лигандов. Среди лигандов во внеклеточном матриксе можно назвать такие белки, как коллаген, которые содержат узнаваемую интегринной последовательность RGD, или такие протеогликаны, как гепарансульфат. Связывание внеклеточного лиганда вызывает изменения конформации цитозольных доменов, влияющие на взаимодействие интегрин с белками, например с талином, который, в свою очередь, связывает интегрин с актиновыми филаментами цитоскелета, поддерживающего плазматическую мембрану. Связывание внутриклеточных белковых лигандов с цитозольным доменом влияет на сродство интегрин к внеклеточным партнерам, изменяя адгезию клеток на внеклеточном матриксе.

подвижность, полярность и дифференцировку клеток многих видов. При передаче внешнего сигнала внутрь клетки связывание лиганда на расстоянии многих ангстрем от трансмембранной спирали приводит к тому, что внеклеточные домены интегринов претерпевают значительные конформационные изменения. Эти изменения влияют на расположение цитоплазматических «хвостов» α - и β -субъединиц, изменяя характер их взаимодействия с внутриклеточными белками и тем самым передавая сигнал внутрь клетки. Конформация и адгезивные свойства внеклеточных доменов интегринов также сильно изменяются при передаче сигнала из клетки. В одной из конформаций внеклеточные домены теряют сродство к белкам внеклеточного матрикса, но идущие из клетки сигналы могут благоприятствовать образованию другой конформации, которая способствует прочному связыванию интегринов с внеклеточными белками (рис. 12-28).



Регуляция адгезионной способности клеток играет ключевую роль в миграции лейкоцитов к участкам проникновения инфекции (см. рис. 7-31), во взаимодействиях между клетками иммунной системы, а также в фагоцитирующей активности макрофагов. Например, в процессе иммунного ответа интегрин лейкоцитов активируется (экспонируя свои внеклеточные участки связывания лиганда) изнутри клетки через сигнальный путь, инициированный цитокинами (внеклеточные сигналы развития). Активированные таким образом интегрин могут служить посредниками в прикреплении лейкоцитов к другим клеткам иммунной системы или метить клетки, предназначенные для уничтожения путем фагоцитоза. Мутация гена интегрин, кодирующего β -субъединицу, известную как CD18, приводит к нарушению адгезии лейкоцитов — редкому генетическому заболеванию человека, при котором лейкоциты не могут проникать сквозь стенки кровеносных сосудов к инфицированным участкам. Дети с тяжелыми нарушениями CD18 обычно умирают от инфекционных заболеваний в возрасте до двух лет.

Специфический интегрин тромбоцитов $\alpha_{IIb}\beta_3$ участвует в процессе свертывания крови как в норме, так и при патологиях. Локальные повреждения кровеносных сосудов при ранах и ушибах приводят к экспонированию высокоаффинных центров, например последовательности RGD в тромбине и коллагене, где могут связываться интегрин тромбоцитов, прикрепляясь к

поврежденным участкам, к другим тромбоцитам, а также к белку фибриногену, что способствует образованию кровяного сгустка, препятствующего дальнейшему кровотечению. Мутации α - или β -субъединицы тромбоцитарного интегрин $\alpha_{IIb}\beta_3$ приводят к нарушению свертывания крови; у людей с этим заболеванием, называемым тромбастенией Гланцманна, сравнительно небольшие повреждения вызывают сильные кровотечения. Но слишком активное образование кровяных сгустков также нежелательно. Нарушение регуляции адгезии тромбоцитов может привести к патологии системы свертывания крови, сопровождающейся закупоркой артерий, поставляющих кровь к сердцу и головному мозгу, что повышает риск сердечных приступов и инсультов. Такие лекарственные препараты, как тирофибан и эптифибатид, блокируют внешние участки связывания лигандов в интегрин тромбоцитов, тем самым ослабляя процесс образования сгустков; эти препараты применяют для лечения и предотвращения сердечных приступов и инсультов. При метастазирующих опухолях опухолевые клетки не удерживаются пораженной опухолью тканью, а прикрепляются в других местах. Интегрин принимают участие как в изменении характера адгезии опухолевых клеток, так и в формировании новых кровеносных сосудов, снабжающих кровью вновь образованные опухоли. Таким образом, эти белки являются потенциальными мишенями для новых лекарственных препаратов, которые должны подавлять миграцию и переселение опухолевых клеток. ■

Краткое содержание раздела 12.7 ИНТЕГРИНЫ: ДВУНАПРАВЛЕННЫЕ РЕЦЕПТОРЫ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА КЛЕТОЧНУЮ АДГЕЗИЮ

- Интегрин представляют собой семейство димерных ($\alpha\beta$) рецепторов плазматической мембраны, которые взаимодействуют с внеклеточными макромолекулами и с цитоскелетом, проводя сигналы в клетку и из клетки.
- Активные и неактивные формы интегринов различаются конформацией внеклеточных доменов. Внутриклеточные сигналы и происходящие в клетке события могут приводить к взаимным превращениям активной и неактивной форм интегрин.

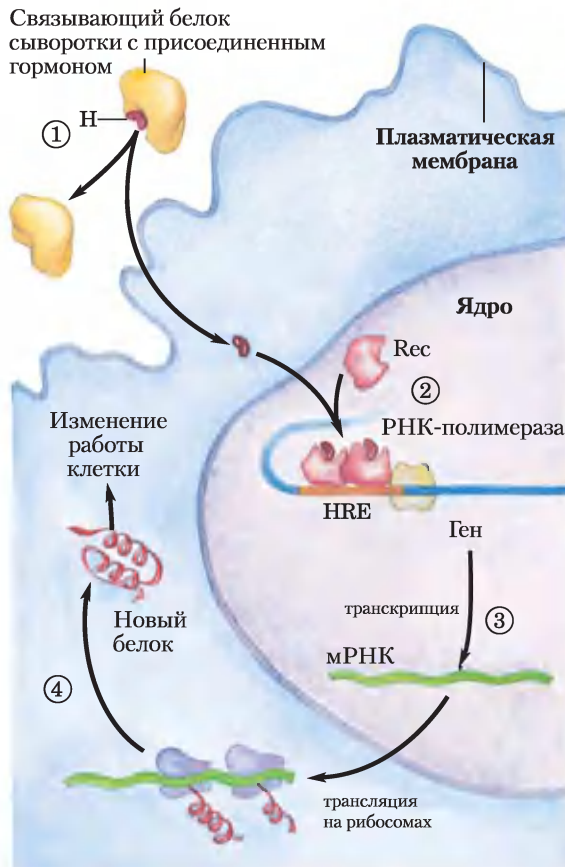
- Интегрины участвуют в различных иммунных процессах, в свертывании крови и ангиогенезе, а также в метастазировании опухолей.

12.8. Регуляция транскрипции стероидными гормонами

Большая группа стероидных, ретиноидных (ретиноевая кислота) и тиреоидных гормонов оказывает действие по механизму, коренным образом отличному от механизма действия других гормонов: они действуют в ядре, изменяя экспрессию генов. Детально этот способ действия мы обсудим в гл. 28 вместе с другими механизмами регуляции экспрессии генов. Здесь дадим лишь краткий обзор.

Стероидные гормоны (например, эстроген, прогестерон и кортизон) гидрофобны и плохо рас-

творяются в крови; они переносятся от места их высвобождения к тканям-мишеням специфическими белками-переносчиками. В клетках-мишенях эти гормоны проходят через плазматическую мембрану путем диффузии и связываются со специфическими рецепторными белками, локализованными в ядре (рис. 12-29). Связывание гормона вызывает изменения в конформации рецепторных белков, они приобретают способность взаимодействовать со специфическими регуляторными последовательностями в ДНК, называемыми **элементами гормонального ответа (HRE** — от англ. *hormone response elements*); таким образом происходит изменение экспрессии генов (см. рис. 28-34). Комплекс рецептор-гормон может либо усиливать, либо подавлять экспрессию специфических генов, соседствующих с HRE. Для того чтобы эти регуляторы полностью оказали свое действие,

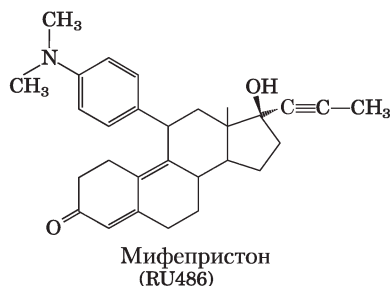
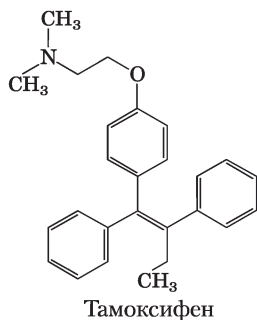


- ① Гормон (H), перенесенный к ткани-мишени связывающими белками сыворотки, диффундирует через плазматическую мембрану и связывается со своим специфическим рецепторным белком (Rec) в ядре.
- ② Связывание гормона изменяет конформацию Rec; он образует гомо- или гетеродимеры с другими комплексами гормон-рецептор и присоединяется к специфическим регуляторным участкам, называемым элементами гормонального ответа (HRE) на ДНК, по соседству со специфическими генами.
- ③ Рецептор привлекает белки-коактиваторы или корепрессоры и вместе с ними регулирует скорость образования мРНК.
- ④ Изменившийся уровень продукта регулируемого гормоном гена представляет собой клеточный ответ на действие гормона.

Рис. 12-29. Общий механизм, посредством которого стероидные и тиреоидные гормоны, ретиноиды и витамин D регулируют экспрессию генов. Детали транскрипции и синтеза белков обсуждаются в гл. 26 и 27. Некоторые стероиды действуют также через плазматическую мембрану, но по совершенно другому механизму.

требуются часы или дни — это время нужно, чтобы изменения в синтезе ДНК и в последующем синтезе белка проявились в метаболизме.

Тамоксифен Специфичность взаимодействия стероид–рецептор используется при лечении рака молочной железы препаратом **тамоксифеном**. При некоторых типах опухолей груди деление раковых клеток обусловлено постоянным присутствием гормона эстрогена. Тамоксифен конкурирует с эстрогеном за связывание с рецептором эстрогена, но комплекс тамоксифен–рецептор оказывает слабый эффект или не оказывает никакого действия на экспрессию генов. Тамоксифен — антагонист эстрогена и введенный после хирургического вмешательства или при химиотерапии гормонзависимого рака молочной железы замедляет или останавливает рост оставшихся раковых клеток. Другой аналог стероидов препарат **мифепристон (RU486)** применяется для прерывания беременности на ранних сроках. Как антагонист гормона прогестерона RU486 связывается с рецептором прогестерона и блокирует действие гормона, необходимое для имплантации оплодотворенной яйцеклетки в матку. ■



Некоторые эффекты действия стероидов проявляются настолько быстро, что вряд ли обусловлены изменением синтеза белка по классическому механизму действия стероидных гормонов с участием ядерных рецепторов. Например, опос-

редованное эстрогенами расширение кровеносных сосудов, как известно, не зависит от транскрипции генов или синтеза белка, поскольку при действии стероидов происходит уменьшение концентрации сАМР. Такие эффекты, вероятно, достигаются за счет какого-то другого механизма передачи сигнала.

Краткое содержание раздела 12.8 РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ СТЕРОИДНЫМИ ГОРМОНАМИ

- Стероидные гормоны проникают в клетку и связываются со специфическими рецепторными белками.
- Комплекс гормон–рецептор присоединяется к специфическим участкам ДНК, называемым элементами гормонального ответа (HRE) и, взаимодействуя с другими белками, регулирует экспрессию соседних генов.
- Определенное действие стероидных гормонов достигается посредством других более быстрых сигнальных путей.

12.9. Сигнализация у микроорганизмов и растений

Многое из того, что мы рассказали здесь о сигнализации, касается тканей млекопитающих или культур клеток, полученных из этих тканей. Бактерии, археи, эукариотические микроорганизмы и сосудистые растения тоже должны отвечать на множество внешних сигналов, таких как кислород, питательные вещества, свет, вредные химические вещества и т. д. Теперь перейдем к краткому рассмотрению сигнальных систем, которые используют микроорганизмы и растения.

Сигнализация у бактерий включает фосфорилирование в двухкомпонентной системе

Бактерия *Escherichia coli* реагирует на многие питательные вещества в окружающей среде, в том числе на сахара и аминокислоты, перемещением по направлению к ним, которое осуществляет-

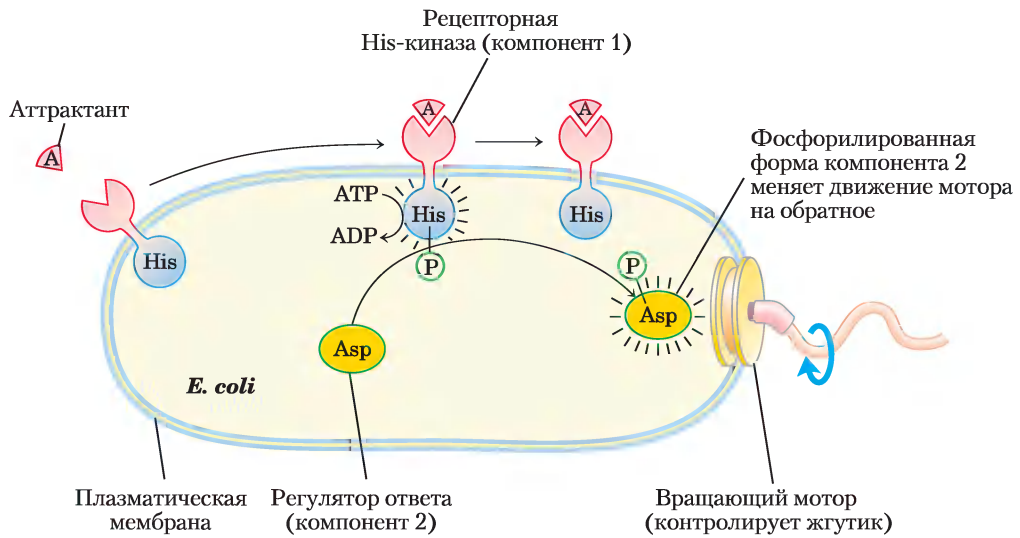


Рис. 12-30. Двухкомпонентный механизм сигнализации при бактериальном хемотаксисе.

При связывании на мембране аттрактанта А (лиганд) с рецепторным доменом протеингистидинкиназы ее цитозольный домен (компонент 1) активируется и аутофосфорилируется по остатку His. Затем эта фосфорильная группа переносится на остаток Asp компонента 2 (отдельный белок или другой домен рецепторного белка). После фосфорилирования по Asp компонент 2 перемещается к основанию жгутика, где он определяет направление вращения мотора.

ся с помощью одного или нескольких жгутиков. Связывающие домены мембранных белков на внешней стороне плазматической мембраны, присоединяют специфические **аттрактанты** (лиганды — сахара или аминокислоты; **рис. 12-30**). Связывание лиганда приводит к тому, что другой домен этого белка на внутренней стороне плазматической мембраны фосфорилирует сам себя по остатку His. Затем этот первый компонент **двухкомпонентной системы, рецепторная гистидинкиназа**, катализирует перенос фосфорильной группы с остатка His на остаток Asp в растворимом **белке-регуляторе ответа**. Этот фосфопротеин — второй компонент двухкомпонентной системы; он перемещается к основанию жгутика, перенося сигнал от мембранного рецептора. Жгутик приводится в движение ротором (мотором), что позволяет клетке передвигаться или заставляет ее останавливаться в зависимости от направления вращения мотора. Информация от рецептора позволяет клетке двигаться по направлению к аттрактанту или от него. Если клетка приближается к аттрактанту, регулятор ответа

дает команду продолжать прямолинейное движение; при удалении от аттрактанта, клетка мгновенно изменяет направление, т. е. она движется по случайной траектории, но в направлении увеличивающейся концентрации аттрактанта.

Используя эту основную двухкомпонентную систему, *E. coli* реагирует не только на сахара и аминокислоты, но также на кислород, перепады температуры и другие факторы окружающей среды. Двухкомпонентная система обнаружена у многих бактерий, как у грамположительных, так и у грамотрицательных, а также у архей, простейших и грибов. Очевидно, что этот механизм сигнализации развился на ранней стадии клеточной эволюции и впоследствии был сохранен.

Различные сигнальные системы, животных клеток имеют аналоги также у прокариот. По мере того как становились известны полные геномные последовательности все большего числа бактерий, исследователи открывали гены, которые кодируют белки, аналогичные серин- или тирозинкиназам, Ras-подобные белки, регулируемые связыванием с GTP, и белки с SH3-доменами.

Рецепторные Туг-киназы не обнаружены у бактерий, но в некоторых бактериальных белках встречаются остатки P-Tug , поэтому должен существовать и фермент, который фосфорилирует остатки Туг.

Сигнальные системы растений содержат компоненты сигнальных систем микроорганизмов и млекопитающих

Подобно животным, сосудистые растения должны иметь средства коммуникации между тканями для того, чтобы координировать и регулировать рост и развитие; чтобы адаптироваться к кислородному режиму, питательным веществам, свету и температуре; чтобы предупреждать о присутствии вредных химических веществ и повреждающих патогенных факторов (рис. 12-31). С тех пор, когда разошлись растительные и животные ветви эукариот, миновал по крайней мере миллиард лет эволюции. Это отразилось на механизмах сигнализации: некоторые механизмы сигнализации

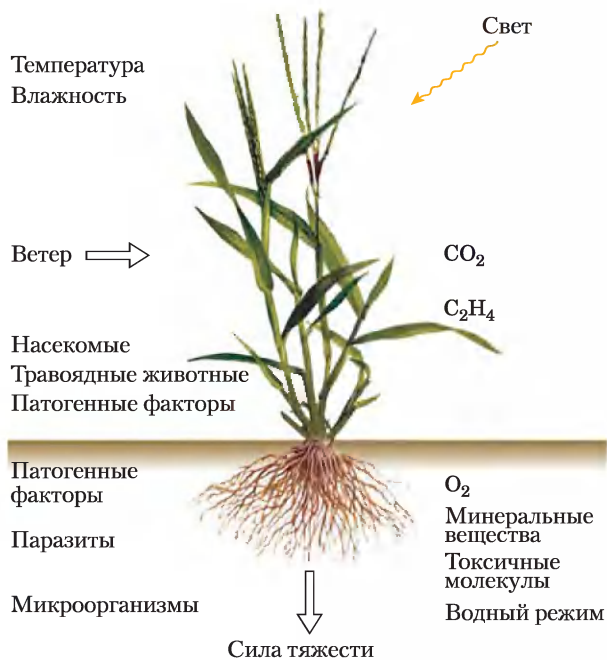


Рис. 12-31. Некоторые стимулы, вызывающие ответы в растениях.

Компонент сигнальной системы	Млекопитающие	Растения	Бактерии
Ионные каналы	+	+	+
Электрогенные ионные насосы	+	+	+
Двухкомпонентные His-киназы	+	+	+
Аденилатциклаза	+	+	+
Гуанилатциклаза	+	+	?
Рецепторные протеинкиназы (Ser/Thr)	+	+	?
Ca ²⁺ как вторичный мессенджер	+	+	?
Ca ²⁺ -каналы	+	+	?
Кальмодулин, CaM-связывающий белок	+	+	–
Каскад MAPK	+	+	–
Каналы, управляемые циклическим нуклеотидом	+	+	–
IP ₃ -регулируемые Ca ²⁺ -каналы	+	+	–
Фосфатидилинозиткиназы	+	+	–
GPCR	+	+/-	+
Тримерные G-белки	+	+/-	–
PI-специфическая фосфолипаза C	+	?	–
Тирозинкиназные рецепторы	+	?	–
SH2-домены	+	?	?
Ядерные рецепторы стероидов	+	–	–
Протеинкиназа A	+	–	–
Протеинкиназа G	+	–	–

у растений консервативны, т. е. подобны механизмам, присущим животным (протеинкиназы, адаптерные белки, циклические нуклеотиды, электрогенные ионные насосы и регулируемые ионные каналы); некоторые сходны с бактериальными двухкомпонентными системами; другие свойственны исключительно растениям (например, механизмы, воспринимающие свет) (табл. 12-7). Геном всесторонне изученного растения *Arabidopsis thaliana*, например, кодирует почти 1000 белковых Ser/Thr-киназ, в том числе около 60 MAPK и 400 ассоциированных с мембраной рецепторных киназ, которые фосфорилируют остатки Ser или Thr; множество протеинфосфатаз; адаптерные белки, собирающие другие белки в сигнальные комплексы; ферменты для синтеза и деградации циклических нуклеотидов; и 100 или более ионных каналов, включая примерно 20 ре-

гулируемых циклическими нуклеотидами. Присутствуют также инозитфосфолипиды и киназы, которые превращают их один в другой путем фосфорилирования полярных инозитольных групп.

Однако некоторые сигнальные белки, широко распространенные в тканях животных, у растений отсутствуют или представлены только небольшим числом генов, например, по-видимому, отсутствуют циклонуклеотидзависимые протеинкиназы (PKA и PKG). Гены гетеротримерных G-белков и протеинтирозинкиназы гораздо реже встречаются в геномах растений, а гены GPCR (самое большое семейство в геноме человека, ~1000 генов) очень бедно представлены в растительном геноме. Ядерные рецепторы стероидов, связанные с ДНК, в растениях не обнаружены — они, возможно, вообще отсутствуют там. Хотя в растениях отсутствует большинство широко распространенных общих светочувствительных механизмов, которые имеются у животных (родопсин с ретиналем в качестве пигмента), но есть широкий набор других воспринимающих свет механизмов, не обнаруженных в тканях животных, например фитохромы и криптохромы (гл. 19).

Классы соединений, продуцирующие сигналы в растениях, сходны с некоторыми сигнальными молекулами у млекопитающих (рис. 12-32). Вместо простагландинов растения образуют жасмонат; вместо стероидных гормонов — брассиностероиды. Сигнальными веществами в растениях служат около 100 разнообразных низкомолекулярных пептидов. И растения, и животные используют в качестве сигнальных производные ароматических аминокислот.

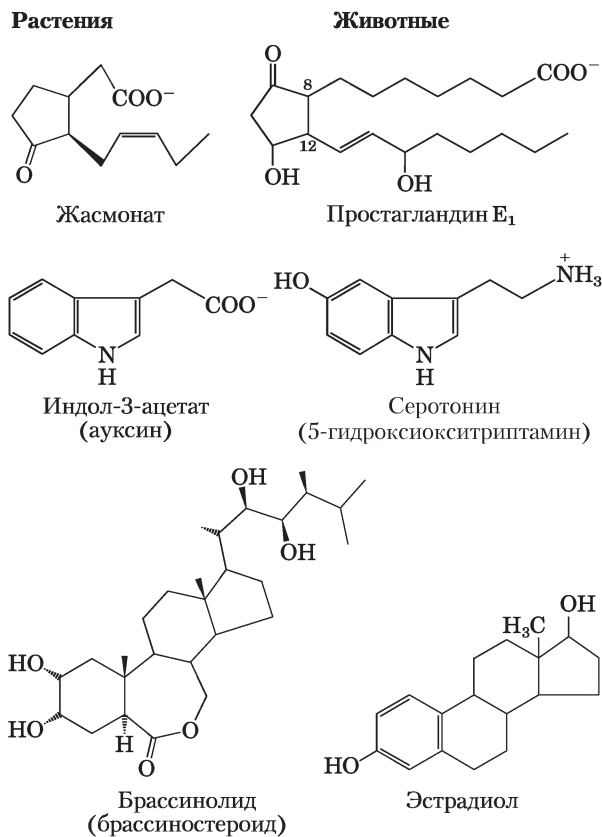


Рис. 12-32. Структурное сходство между растительными и животными сигнальными веществами. Растительные сигнальные вещества жасмонат, индол-3-ацетат и брассинолид похожи на сигнальные вещества млекопитающих простагландин E₁, серотонин и эстрадиол.

Растения обнаруживают этилен с помощью двухкомпонентной системы и каскада MAPK

Рецепторы газообразного растительного гормона этилена (CH₂=CH₂) по первичной структуре сходны с рецепторными His-киназами бактериальных двухкомпонентных систем и, вероятно, развились из них в процессе эволюции. У р. *Arabidopsis* двухкомпонентная сигнальная система состоит из единственного интегрального белка эндоплазматического ретикулума (а не плазматической мембраны). Этилен диффундирует в клетку через плазматическую мембрану и проникает в ЭР. Первый компонент этиленовой сигнализации — это протеин-Ser/Thr-киназа (CTR-1; рис. 12-33) с

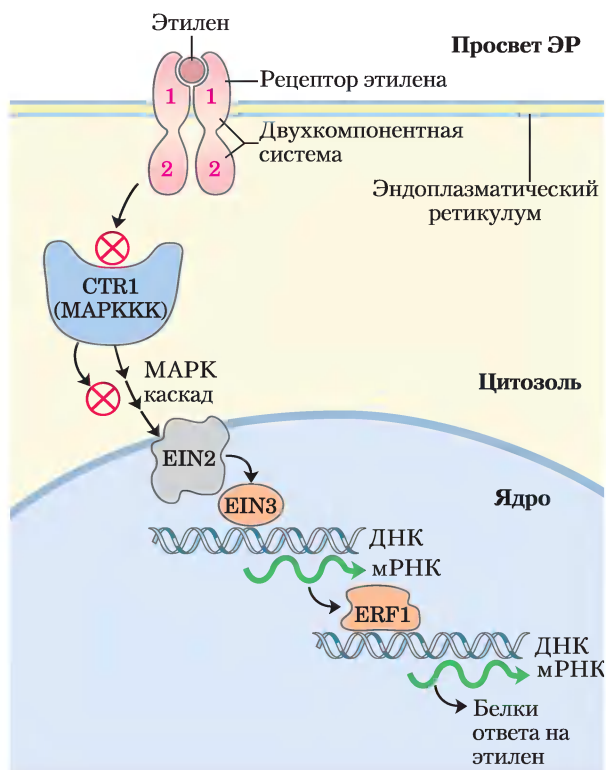


Рис. 12-33. Механизм передачи сигнала при обнаружении этилена растениями. Этиленовый рецептор в плазматической мембране (розовый цвет) представляет собой двухкомпонентную систему из одного белка, который имеет рецепторный домен (компонент 1) и домен-регулятор ответа (компонент 2). Рецептор регулирует (каким образом — мы пока не понимаем) активность CTR1 — протеинкиназы, подобной MAPKK киназам и, вероятно, участвующий в каскаде MAPK. CTR1 — отрицательный регулятор ответа на этилен; когда CTR1 неактивна, этиленовый сигнал проходит через продукт гена EIN2 (полагают, что это белок ядерной оболочки), который каким-то образом вызывает увеличение синтеза ERF1 — фактора транскрипции; ERF1 в свою очередь стимулирует экспрессию белков, специфических для ответа на действие этилена.

последовательностью, гомологичной Raf — протеинкиназе, которая у млекопитающих начинает каскад MAPK в ответ на действие инсулина (ср. рис. 12-15). У растений в отсутствие этилена киназа CTR-1 активна и *ингибирует* каскад MAPK, препятствуя транскрипции этиленчувствительных генов. Этилен *инактивирует* киназу CTR-1, активируя тем самым каскад MAPK, что приводит к активации фактора транскрипции EIN3.

Активный EIN3 стимулирует синтез второго фактора транскрипции (ERF1), который в свою очередь активирует транскрипцию ряда этиленчувствительных генов; продукты этих генов влияют на процессы развития растений — от образования семян до созревания плодов.

Очевидно, возникшая из бактериальной двухкомпонентной сигнальной системы этиленовая система у р. *Arabidopsis* отличается тем, что His-киназная активность, которая у бактерий является компонентом 1, несущественна при передаче сигнала у р. *Arabidopsis*.

Рецептороподобные протеинкиназы осуществляют передачу сигналов от пептидов и brassinosterоидов

В передаче сигналов в растениях обязательно участвует **рецептороподобная протеинкиназа (RLK от англ. *receptorlike kinases*)**, содержащая один спиральный домен в плазматической мембране, который осуществляет связь рецепторного домена на внешней стороне мембраны с протеин-Ser/Thr-киназой на цитоплазматической стороне. Этот рецептор участвует в механизме защиты при инфицировании бактериальным патогеном (рис. 12-34, а). Сигналом для генов, необходимых для защиты против инфекции, служит пептид flg22, высвобождаемый при распаде флагеллина — основного белка бактериального жгутика. Связывание flg22 с рецептором FLS2 у р. *Arabidopsis* вызывает димеризацию рецептора и его аутофосфорилирование по остаткам Ser и Thr, а последующим эффектом является активация каскада MAPK подобно тому, как это было описано выше для действия инсулина (рис. 12-15). Конечная киназа в этом каскаде активирует специфический фактор транскрипции, запускающий синтез белков защиты от бактериальной инфекции. Стадии между фосфорилированием рецептора и каскадом MAPK пока неизвестны. Для прекращения ответа на стимул с активным рецепторным белком связывается фосфопротеинфосфатаза (KAPP), которая инактивирует его путем дефосфорилирования.

Каскад MAPK в защите растений против бактериальных патогенов поразительно похож на генетически детерминированный иммунный ответ у млекопитающих (рис. 12-34, б), запу-

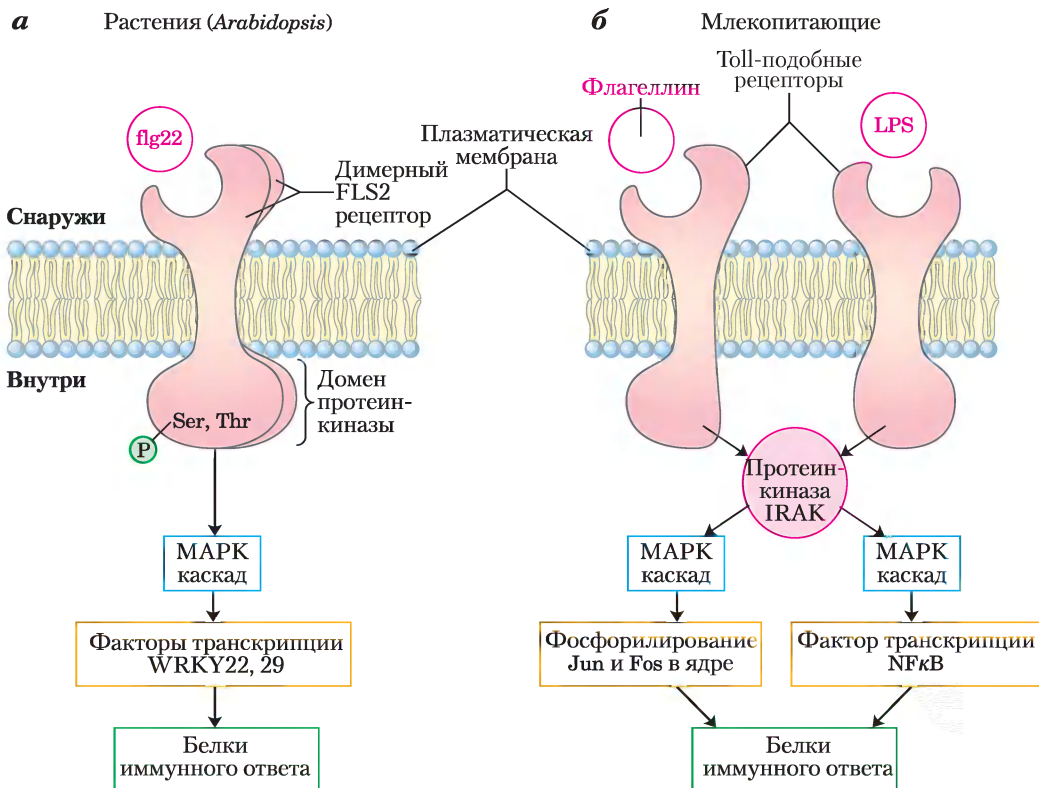


Рис. 12-34. Сравнение сигнальных путей, запускающих иммунные ответы у растений и животных. *а*) У растения *Arabidopsis thaliana* пептид flg22, происходящий из жгутиков бактериального патогена, связывается с рецептором на плазматической мембране, вызывая образование из рецепторов димеров и запуская аутофосфорилирование цитозольного протеинкиназного домена по остаткам Ser и Thr (*не* Tyr). Аутофосфорилирование активирует рецепторную протеинкиназу, которая затем фосфорилирует последующие в каскаде белки. Активированный рецептор активирует также MAPKKK (неизвестно, каким образом). Итоговый киназный каскад приводит к фосфорилированию ядерного белка, который обычно ингибирует факторы транскрипции WRKY22 и 29, приводя к деградации ингибитора и давая возможность факторам транскрипции стимулировать экспрессию генов, имеющих отношение к иммунному ответу. *б*) У млекопитающих токсический бактериальный липополисахарид (ЛПС; см. рис. 7-30) обнаруживается рецепторами плазматической мембраны, которые связываются с растворимой протеинкиназой (IRAK) и активируют ее. Основной жгутиковый белок патогенной бактерии действует через похожий рецептор и активирует IRAK. Затем IRAK инициирует два параллельных каскада MAPK, которые заканчиваются в ядре, вызывая синтез белков, необходимых для иммунного ответа. Jun, Fos, NFκB — факторы транскрипции.

скаемый бактериальным липополисахаридом и опосредуемый Toll-подобными рецепторами (TLR, от мутанта р. *Drosophila*, который обычно называют «Toll» — от нем. сумасшедший; впоследствии TLR были обнаружены у многих организмов и было показано их участие в эмбриогенезе). Другие мембранные рецепторы используют похожие механизмы активации каскада MAPK, активируя на конечной стадии

факторы транскрипции и вводя в действие гены, необходимые для защитной реакции.

Предполагают, что из нескольких сотен рецептороподобных киназ (RLK) в растениях большинство работают следующим образом: связывание лиганда индуцирует димеризацию и аутофосфорилирование, а активированные рецепторные киназы запускают последующие реакции путем фосфорилирования ключевых белков по остаткам Ser и Thr.

Краткое содержание раздела 12.9 СИГНАЛИЗАЦИЯ У МИКРООРГАНИЗМОВ И РАСТЕНИЙ

- Бактерии и эукариотические микроорганизмы обладают множеством разнообразных сенсорных систем, которые позволяют им «брать пробы» окружающей среды и реагировать на соответствующие воздействия. В двухкомпонентной системе рецепторная His-киназа воспринимает сигнал и аутофосфорилирует остаток His, затем фосфорилирует белок-регулятор ответа по остатку Asp.
- Растения отвечают на многие стимулы окружающей среды и используют гормоны и факторы роста для того, чтобы координировать развитие и метаболическую активность своих тканей. Геном растений кодирует сотни сигнальных белков, в том числе и некоторые белки, очень похожие на используемые для передачи сигналов в клетках млекопитающих.
- Двухкомпонентные механизмы сигнализации, широко распространенные у бактерий, обнаружены в измененной форме у растений, где служат для детекции химических сигналов и света.
- Растительные рецептороподобные киназы (RLK) участвуют в восприятии множества стимулов, в том числе brassinостероидов, пептидов патогенных организмов и сигналов, участвующих в процессе развития. Киназы RLK аутофосфорилируют остатки Ser/Thr, затем активируют последующие белки, которые в некоторых случаях образуют каскад MAPK. Результатом множества сигналов такого рода является усиление транскрипции специфических генов.

12.10. Сенсорная передача сигнала в процессах зрения, обоняния и вкуса

Восприятие света, запахов и вкусовых ощущений (зрение, обоняние и вкус) у животных осуществляется специализированными сенсорными нейронами, которые используют механизмы передачи сигналов, в своей основе сходные с меха-

низмами, работающими при действии гормонов, нейромедиаторов и ростовых факторов. Первоначальный сенсорный сигнал в большой степени усиливается с помощью механизмов, включающих регулируемые ионные каналы и внутриклеточные вторичные мессенджеры; система адаптируется к продолжительной стимуляции, изменяя свою чувствительность к стимулу (десенситилизация); и наконец, сенсорные сигналы от разных рецепторов (на разных входах) интегрируются перед тем, как конечный сигнал поступит в мозг.

В зрительной системе работает классический механизм GPCR

В глазу позвоночных свет, входящий через зрачок, фокусируется на высокоорганизованном скоплении светочувствительных нейронов (рис. 12-35). Светочувствительные клетки глаза относятся к двум

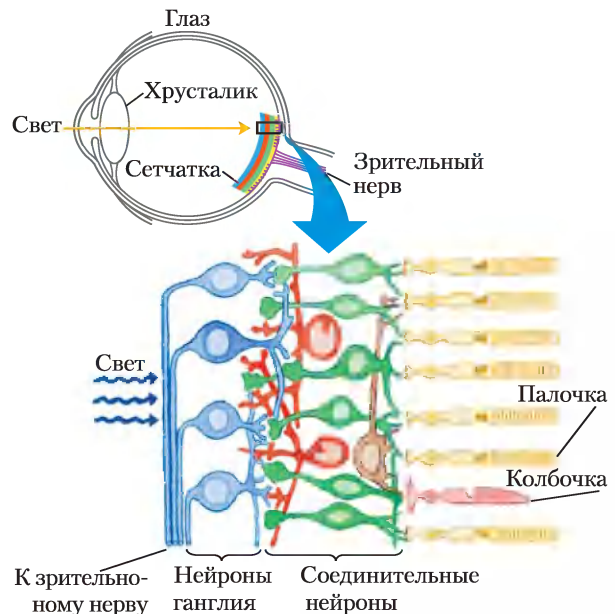


Рис. 12-35. Восприятие света глазом позвоночного. Хрусталик глаза фокусирует свет на сетчатке, которая состоит из слоев нейронов. Первичные фотосенсорные нейроны — это палочки (желтый цвет), которые отвечают за ночное зрение и зрение с высоким разрешением, и колбочки трех подтипов (розовый цвет), которые обеспечивают цветное зрение. Палочки и колбочки образуют синапсы с несколькими видами соединительных нейронов, которые передают и интегрируют электрические сигналы. В конце эти сигналы проходят через зрительный нерв от нейронов ганглии в мозг.

типам: палочки (около 10^9 клеток на всю сетчатку), которые воспринимают низкий уровень освещенности, но не могут определять цвета, и колбочки (около $3 \cdot 10^6$ клеток на всю сетчатку), которые менее чувствительны к свету, но могут различать цвета. Оба типа клеток представляют собой длинные, узкие специализированные сенсорные нейроны с двумя отдельными клеточными компартментами: внешний сегмент содержит множество мембранных дисков, нагруженных мембранным белком родопсином, внутренний сегмент содержит ядро и много митохондрий, которые производят АТФ, необходимый для передачи зрительного сигнала.

Подобно другим нейронам, на палочках и колбочках возникает трансмембранный электрический потенциал (V_m), обусловленный работой ионного насоса Na^+/K^+ -АТФазы в плазматической мембране внутреннего сегмента (рис. 12-36). Существенный вклад в мембранный потенциал вносит также ионный канал в наружном сегменте. Он делает возможным перенос либо Na^+ , либо Ca^{2+}

и регулируется (открывается) с помощью cGMP. В темноте палочки содержат достаточное количество cGMP для поддержания канала в открытом состоянии. Мембранный потенциал, таким образом, определяется суммарным транспортом Na^+ и K^+ (суммарным изменением их концентрации внутри и снаружи) через внутренний сегмент (поляризацией мембраны) и входом Na^+ через ионные каналы внешнего сегмента (деполяризацией мембраны).

Суть сигнального пути в палочках или колбочках сетчатки заключается в происходящем под действием света уменьшении концентрации cGMP, что приводит к закрыванию cGMP-регулируемых ионных каналов. Благодаря работе Na^+/K^+ -АТФазы плазматическая мембрана становится гиперполяризованной. Палочки и колбочки образуют синапсы с соединительными нейронами (рис. 12-31), которые переносят информацию об электрической активности к нейронам ганглии, находящегося у внутренней поверх-

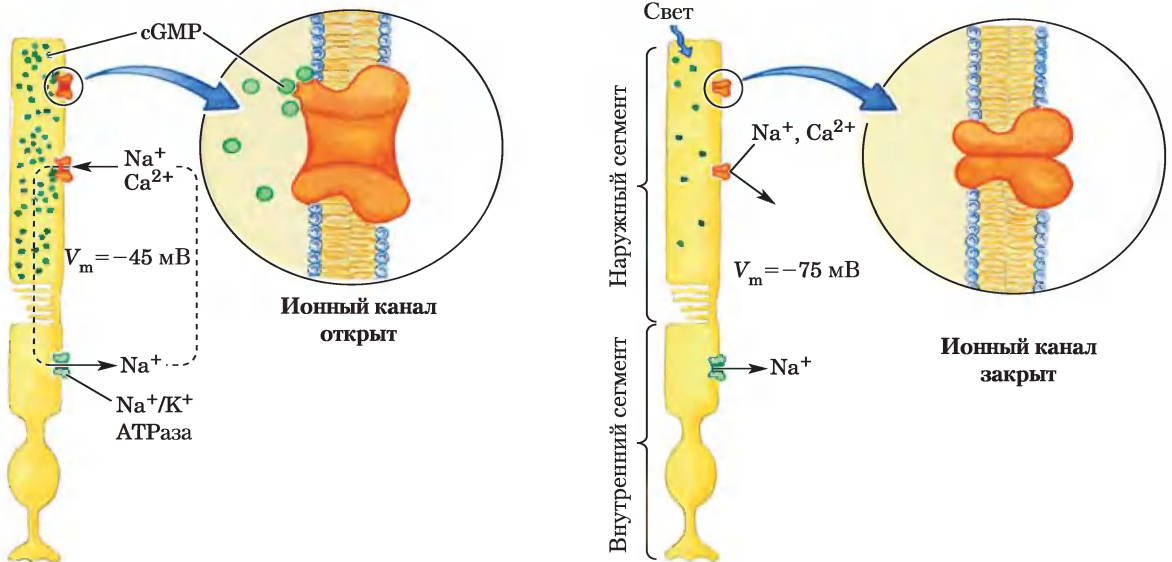


Рис. 12-36. Индуцированная светом гиперполяризация палочек. Палочка состоит из внешнего сегмента, который заполнен стопками мембранных дисков (здесь не показаны), содержащими фоторецептор родопсин, и внутреннего сегмента, в котором находятся ядро и другие органеллы. Колбочки имеют похожее строение. Во внутреннем сегменте АТФ приводит в действие Na^+/K^+ -АТФазу, которая создает трансмембранный электрический потенциал, выкачивая наружу 3 Na^+ на каждые 2 K^+ , закачиваемые внутрь. Мембранный потенциал уменьшается из-за потока Na^+ и Ca^{2+} , поступающих в клетку через cGMP-регулируемые катионные каналы плазматической мембраны наружного сегмента. Поглощая свет, родопсин запускает процесс деградации cGMP (зеленые точки) в наружном сегменте, что приводит к закрытию катионного канала. В отсутствие входа катионов через этот канал клетка гиперполяризуется. Этот электрический сигнал передается в мозг по нейронам (рис. 12-35).

ности сетчатки. Нейроны ганглия интегрируют на выходе информацию, полученную от многих палочек или колбочек, и отправляют результирующий сигнал по зрительному нерву на зрительную кору головного мозга.

Передача зрительного сигнала начинается, когда свет падает на родопсин, многие тысячи

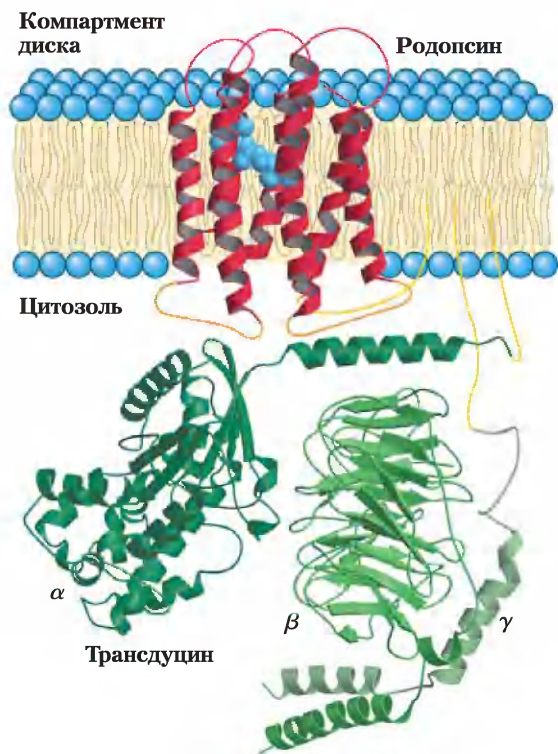


Рис. 12-37. Вероятное строение комплекса родопсина с G-белком трансдуцином (PDB ID 1BAC). Родопсин (красный цвет) содержит семь трансмембранных спиралей, встроенных в мембрану диска наружного сегмента палочки, и ориентирован таким образом, что С-конец находится на цитозольной стороне, а N-конец — внутри диска. Хромофор 11-*цис*-ретинаяль (голубой цвет), образующий основание Шиффа с Lys²⁵⁶ в седьмой спирали, расположен посередине бислоя. (Это расположение напоминает локализацию адреналинсвязывающего сайта в β -адренергическом рецепторе.) Несколько остатков Ser и Thr на С-конце служат субстратами фосфорилирования, которое является частью механизма десенсibilизации родопсина. Для цитозольных петель (оранжевый цвет), взаимодействующих с G-белком трансдуцином, пока неизвестна точная локализация. Показано вероятное расположение трех субъединиц трансдуцина (зеленый цвет). Родопсин на С-конце связан с пальмитоилом; как α -, так и γ -субъединицы трансдуцина присоединены через липиды (желтый цвет), что способствует их закориванию на мембране.

молекул которого находятся в каждом диске наружных сегментов палочек и колбочек. **Родопсин** ($M_r = 40\,000$) — интегральный белок GPCR с характерным строением: он содержит семь пронизывающих мембрану α -спиралей (**рис. 12-37**). N-концевой домен родопсина вдаётся в диск, а С-конец обращен в цитозоль наружного сегмента. Поглощающий свет пигмент (хромофор) **11-*цис*-ретинаяль** ковалентно связан с **опсином**, белковым компонентом родопсина, образуя основание Шиффа с остатком Lys. Ретинаяль расположен почти посередине бислоя (**рис. 12-37**), его длинная ось ориентирована почти в плоскости мембраны. При поглощении фотона ретинаяль превращается в **полностью *транс*-ретинаяль** (см. **рис. 1-18, б, 10-21**). Такое изменение в структуре хромофора вызывает конформационные изменения в молекуле родопсина — это первая стадия проведения зрительного сигнала.

Ретинаяль — производное витамина A₁ (ретинола), образующегося из β -каротина (см. **рис. 10-21**). Недостаток витамина A₁ в пище приводит к куриной слепоте (плохому зрению при слабом уровне освещенности); эта болезнь достаточно широко распространена в некоторых развивающихся странах. Устраняет это заболевание употребление в пищу витамина A или богатых им овощей (таких как морковь). ■

Возбужденный родопсин осуществляет передачу сигнала через G-белок для уменьшения концентрации cGMP

Родопсин в конформации возбужденного состояния взаимодействует со вторым белком **трансдуцином**, который находится вблизи на цитоплазматической стороне мембраны диска (**рис. 12-37**). Трансдуцин (Т) принадлежит к тому же семейству гетеротримерных GTP-связывающих белков, что и G_s и G_i. Он предназначен специально для передачи зрительных сигналов, но имеет много общих функциональных свойств с G_s и G_i. Он может связываться либо с GDP, либо с GTP. В темноте GDP находится в связанном состоянии, все три субъединицы (T _{α} , T _{β} , T _{γ}) остаются вместе и никакого сигнала не посылается. Когда родопсин возбуждается светом, он взаимодействует с трансдуцином, катализи-

руя замещение связанного GDP на GTP из цитозоля (рис. 12-38, стадии ① и ②), а белок трансдуцин диссоциирует на T_α и $T_{\beta\gamma}$. Белок T_α -GTP передает сигнал от возбужденного рецептора на следующий компонент системы сигнализации — сGMP-фосфодиэстеразу (PDE); этот фермент превращает сGMP в 5'-GMP (стадии ③ и ④). Отметим, что это вовсе не та фосфодиэстераза циклических нуклеотидов, которая гидролизует сAMP, чтобы завершить β -адренергический от-

вет. Фермент сGMP-специфичная PDE присутствует только в зрительных клетках сетчатки.

Это интегральный белок с активным центром на цитоплазматической стороне мембраны зрительного диска. В темноте прочно связанная ингибиторная субъединица очень эффективно подавляет активность PDE. Когда T_α -GTP соударяется с PDE, ингибиторная субъединица отделяется, и ферментативная активность немедленно возрастает на несколько порядков. Каждая

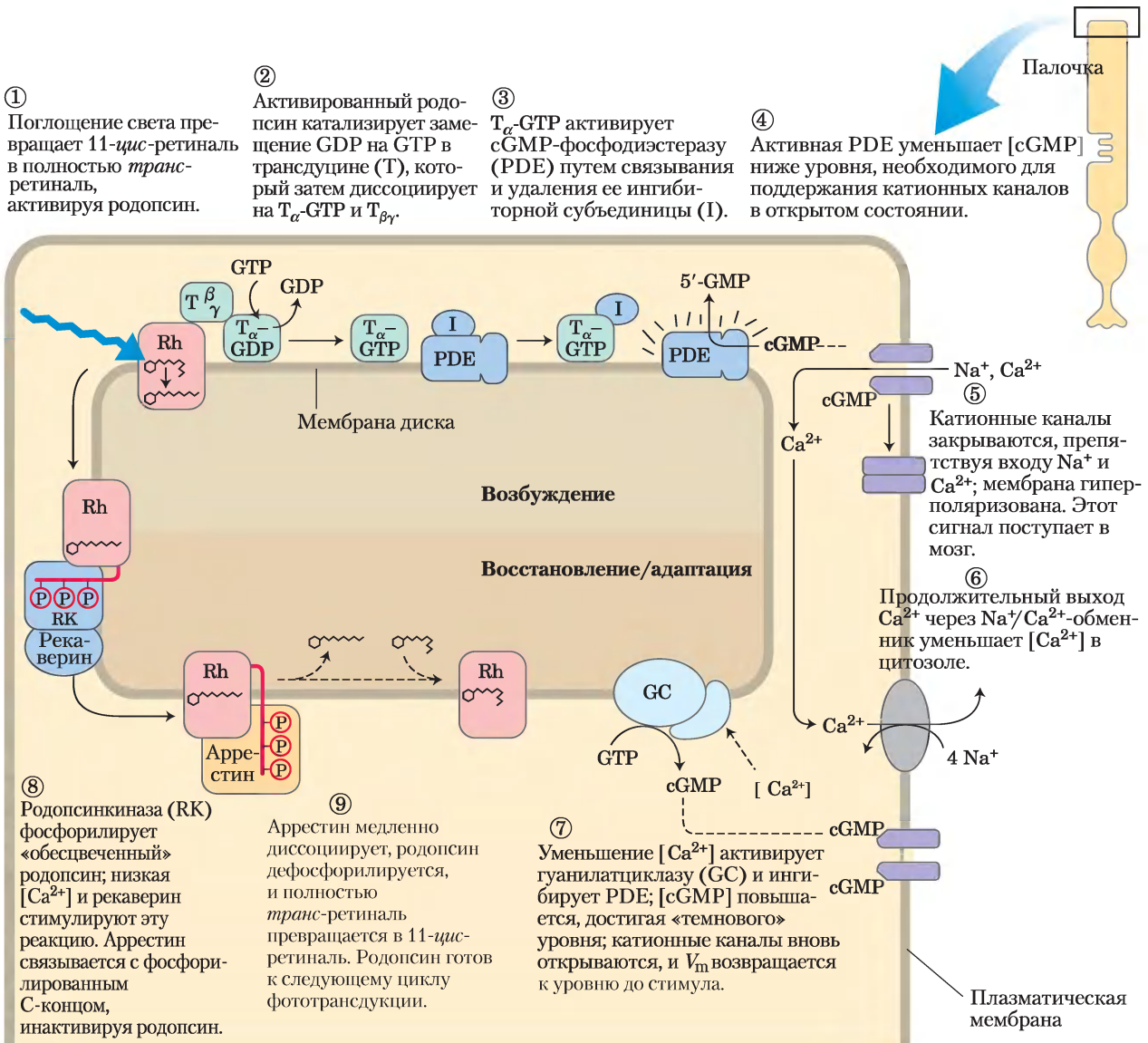


Рис. 12-38. Молекулярные «последствия» поглощения фотона родопсином в наружном сегменте палочки. Вверху (стадии ①–⑤) — возбуждение; внизу (стадии ⑥–⑨) — восстановление и адаптация после освещения.

молекула активной PDE разрушает множество молекул cGMP с образованием биологически неактивного 5'-GMP. При этом концентрация cGMP в наружном сегменте понижается за доли секунды. При новой, более низкой концентрации cGMP cGMP-регулируемые ионные каналы закрываются, блокируя обратный вход Na^+ и Ca^{2+} в наружный сегмент и вызывая гиперполяризацию мембраны клетки палочки или колбочки (стадия ⑤). В этом процессе первоначальный стимул — фотон — изменяет V_m клетки.

За несколько стадий процесса передачи зрительного сигнала происходит огромное его усиление. Одна возбужденная молекула родопсина активирует не менее 500 молекул трансдуцина, а каждая из молекул трансдуцина может активировать молекулу PDE. Этой фосфодиэстеразе свойственно поразительно высокое число оборотов — каждая активированная молекула гидролизует 4 200 молекул cGMP в секунду. Связывание cGMP с cGMP-регулируемыми ионными каналами является кооперативным процессом (чтобы открыть один канал, должны присоединиться, по крайней мере три молекулы cGMP), и относительно небольшое изменение концентрации cGMP проявляется в большом изменении ионной проводимости. Благодаря усилению сигнала чувствительность к свету зрительных клеток очень высокая. Поглощение одного фотона закрывает 1000 или более ионных каналов и примерно на 1 мВ изменяет мембранный потенциал клетки.

Зрительный сигнал быстро прекращается

Ваш взгляд движется по этой строке и изображение первых слов быстро исчезают — еще прежде, чем вы увидите следующие слова. В этот короткий интервал времени происходит множество биохимических процессов. Очень скоро после прекращения освещения фоточувствительная система палочек или колбочек выключается. α -Субъединица трансдуцина (с присоединенным GTP) обладает GTPазной активностью. В течение миллисекунд после уменьшения интенсивности света GTP гидролизует и T_α вновь образует ассоциат с $T_{\beta\gamma}$. Ингибиторная субъединица PDE, которая была связана с T_α -GTP, высвобождается и присоединяется к PDE, полностью ингибируя этот фермент. Чтобы вернуть концентрацию cGMP к ее «темновому» уровню, фермент гуани-

латциклаза превращает GTP в cGMP (стадия ⑦ на рис. 12-38) по реакции, которая ингибируется высокой концентрацией Ca^{2+} (>100 нМ). При освещении уровень кальция в зрительной клетке падает; стационарная концентрация Ca^{2+} в наружном сегменте создается выкачиванием Ca^{2+} с помощью $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника плазматической мембраны и движения Ca^{2+} внутрь через открытые cGMP-регулируемые каналы. В темноте этот процесс обеспечивает $[\text{Ca}^{2+}] \approx 500$ нМ, что достаточно, чтобы ингибировать синтез cGMP. После кратковременного освещения вход Ca^{2+} замедляется и $[\text{Ca}^{2+}]$ падает (стадия ⑥). Ингибирование гуанилатциклазы облегчается, и циклаза превращает GTP в cGMP, чтобы вернуть систему в ее состояние до стимула (стадия ⑦).

Родопсин тоже подвергается изменениям в ответ на продолжительное освещение. Конформационные изменения, индуцированные поглощением света, приводят к тому, что в C-концевом домене становятся доступными несколько остатков Thr и Ser. Они быстро фосфорилируются **родопсинкиназой** (стадия ⑧ на рис. 12-38), по структуре и функции гомологичной β -адренергической киназе (β ARK), которая десенсибилизирует β -адренергический рецептор (рис. 12-8). При высокой концентрации ионов кальция Ca^{2+} -связывающий белок реCOVERIN ингибирует родопсинкиназу, но ингибирование снимается, когда после освещения концентрация Ca^{2+} падает, как описано выше. Фосфорилированный C-концевой домен родопсина связывается с белком **аррестин 1**, что препятствует дальнейшему взаимодействию между активированным родопсином и трансдуцином. Аррестин 1 — близкий гомолог аррестина 2 (β arr; рис. 12-8). Для возвращения молекулы возбужденного родопсина в исходное состояние надо превратить полностью *транс*-ретиналь в 11-*цис*-ретиналь; на это требуется относительно длительное время (от секунд до минут), после чего родопсин готов к новому циклу возбуждения (стадия ⑨ на рис. 12-38).

Колбочки — специализированные клетки, обеспечивающие цветное зрение

Восприятие цвета колбочками основано на механизме передачи сенсорного сигнала, который идентичен описанному выше, но запускается немного другими рецепторами. Видимый свет в разных областях спектра регистрируют три типа колбочек,

содержащих три похожих фоторецепторных белка опсина. Каждая колбочка экспрессирует только один опсин. Все опсины похожи на родопсин по длине, аминокислотной последовательности и, по-видимому, по трехмерной структуре. Различия между опсинами, тем не менее, достаточно существенны, чтобы хромофор 11-*цис*-ретиаль размещался в трех несколько отличающихся компартментах, из-за чего три фоторецептора характеризуются различными спектрами поглощения (рис. 12-39). Мы различаем цвета и оттенки, интегрируя «выход» с колбочек трех типов, каждый из которых содержит один из трех фоторецепторов.

Цветовая слепота, например неспособность отличать красное от зеленого, — очень распространенный генетически наследуемый признак у человека. Различные виды цветовой слепоты возникают из-за разных мутаций опсина. Один тип цветовой слепоты возникает из-за отсутствия красных фоторецепторов; имеющие этот дефект люди называются **минус-красными дихроматами** (они видят только два основных цвета). У других не достает зеленого пигмента, они являются **минус-зелеными дихроматами**.

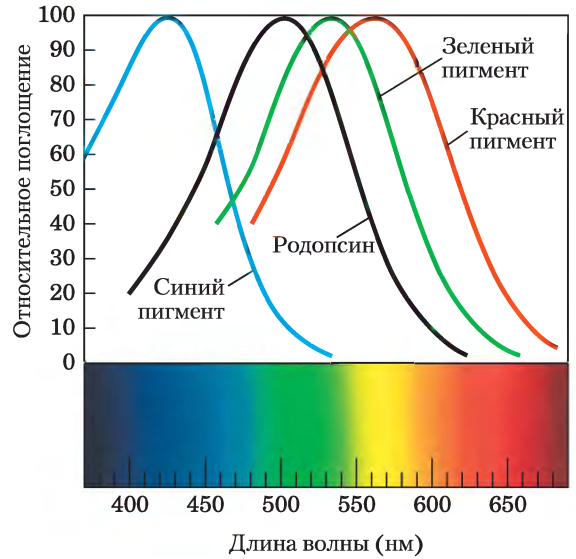


Рис. 12-39. Спектры поглощения очищенного родопсина и красных, зеленых и синих рецепторов колбочек. Спектры, полученные от отдельных клеток-колбочек, выделенных из трупного материала: максимум поглощения при 420, 530 и 560 нм; для родопсина — при 500 нм. Человеческий глаз позволяет увидеть свет в области 380–750 нм.

Дополнение 12-4



МЕДИЦИНА

Цветовая слепота (нарушенное цветовосприятие):

Джон Дальтон спланировал эксперимент, который был завершен более чем через столетие после смерти ученого

Известный английский ученый (автор многих открытий в физике и химии, например он предложил атомистическую теорию строения материи) страдал нарушением цветовосприятия (цветовой слепотой). Он предположил, что в его глазах стекловидное тело (студенистая масса, или гель, заполняющая пространство между хрусталиком и сетчаткой) содержит синий пигмент (светофильтр) и из-за этого искажается восприятие цветов по сравнению с нормальными глазами. Дальтон завещал лаборанту после своей смерти извлечь глаза и изучить их — определить цвет стекловидного тела. Его желание было исполнено. В июле 1844 г. через день после кончины Дальтона Джозеф Рэнсом извлек глаза и обнаружил совершенно бесцветное стекловидное тело в обоих глазах. Как и многие ученые, Рэнсом неохотно выбрасывал образцы. Он поместил глаза Дальтона в сосуд с консервантом (рис. 1), где они хранились в течение полутора столетий.

И вот в середине 1990-х гг. английские молекулярные биологи взяли образцы сетчатки глаз Дальтона и

выделили ДНК. Используя генные последовательности, известные для опсинов красных и зеленых фотопигментов, они амплифицировали соответствующие последовательности (применяя методики, описанные в гл. 9) и определили, что у Дальтона был ген опсина для красного фотопигмента, но не было гена опсина для зеленого фотопигмента. Дальтон был дихроматом, не различавшим зеленый цвет, и это заболевание называют дальтонизмом по имени ученого. Так через 150 лет после смерти ученого начатый им эксперимент по проверке гипотезы о причине его цветовой слепоты был, наконец, завершен.



Рис. 1. Глаза Дальтона

В некоторых случаях присутствуют и красные, и зеленые фоторецепторы, но в них содержатся измененные аминокислотные последовательности, что вызывает сдвиги в их спектре поглощения, приводящие к аномалиям цветного зрения. В зависимости от того, какой пигмент изменен, такие люди являются **аномальными трихроматами с дефектами красного или зеленого пигмента**. Проверка генов зрительных рецепторов позволила поставить диагноз цветовой слепоты у одного известного «пациента» спустя более чем столетие после смерти (доп. 12-4)! ■

Обоняние и вкус у позвоночных основаны на сигнальных механизмах, подобных механизмам зрительной системы

Сенсорные клетки, ответственные за восприятие запаха и вкуса, имеют много общего с палочками и колбочками, которые регистрируют свет. Обонятельные нейроны несут ряд длинных тонких жгутиков, простирающихся от одного конца клетки до слизистого слоя, который покрывает клетку. Эти жгутики обеспечивают большую площадь поверхности взаимодействия с обонятельными сигналами. Рецепторы обонятельных стимулов являются белками мембраны жгутиков с хорошо знакомой структурой GPCR с семью трансмембранными α -спиралями. Обонятельным сигналом может быть любое из множества соединений, для которых имеются специфические рецепторные белки. Наша способность различать запахи обусловлена наличием сотен разных обонятельных рецепторов на языке и носовых каналах, затем поступающая от рецепторов информация интегрируется в головном мозге для того, чтобы распознать общую картину; при этом набор запахов, которые мы способны различать, значительно превосходит число рецепторов.

Обонятельный стимул поступает в сенсорные клетки путем диффузии через воздух. В слизистом слое, покрывающем обонятельные нейроны, молекула пахучего вещества (одоранта) связывается непосредственно с обонятельным рецептором или со специфическим связывающим белком, который переносит одорант к рецептору (рис. 12-40). Взаимодействие между одорантом и рецептором приводит к изменению конформации рецептора, результатом чего является замещение связанного GDP на GTP на G-белке G_{olf} , аналоге

трансдуктина и G_s β -адренергической системы. Затем активированный G_{olf} активирует аденилатциклазу жгутиковой мембраны, которая превращает АТР в сАМР и локальная концентрация сАМР повышается. сАМР-регулируемые Na^+ - и Ca^{2+} -каналы мембраны открываются, а вход Na^+ и Ca^{2+} вызывает небольшую деполяризацию, называемую **рецепторным потенциалом**. Если на рецептор попадает достаточное число молекул одоранта, создается рецепторный потенциал, достаточный для возбуждения потенциала действия в нейроне. Он передается в мозг в несколько стадий и регистрируется как специфический запах. Все эти события происходят за 100–200 мс.

Когда обонятельный стимул перестает действовать, передающая сигнал система отключает сама себя различными способами. Например, сАМР-зависимая фосфодиэстераза возвращает концентрацию сАМР к уровню, который был до стимула. G_{olf} гидролизует связанный GTP до GDP, тем самым самоинактивируясь. Фосфорилирование рецептора специфической киназой препятствует его взаимодействию с G_{olf} по механизму, аналогичному тому, который реализуется при десенсибилизации β -адренергического рецептора и родопсина. И наконец, некоторые одоранты ферментативно разрушаются под действием оксидаз.

Ощущение вкуса у позвоночных обусловлено деятельностью вкусовых нейронов, сгруппированных во вкусовых сосочках на поверхности языка. В этих сенсорных зонах находятся серпентиновые рецепторы, связанные с гетеротримерным G-белком **гастдудином** (очень похож на трансдуктин в палочках и колбочках). Молекулы со сладким вкусом — те, которые связываются с рецепторами на «сладких» вкусовых сосочках. Когда такая молекула связывается с рецептором, гастдудин активируется путем превращения связанного GDP в GTP и затем стимулирует образование сАМР аденилатциклазой. Происходящее вследствие этого увеличение концентрации сАМР активирует РКА, которая фосфорилирует K^+ -каналы в плазматической мембране, заставляя их закрываться. Уменьшение выхода ионов K^+ деполяризует мембрану (рис. 12-41). Другие специализированные вкусовые сосочки передают ощущение горького, кислого или соленого. В механизме передачи сигнала при этом используются различные комбинации вторичных мессенджеров и ионных каналов.

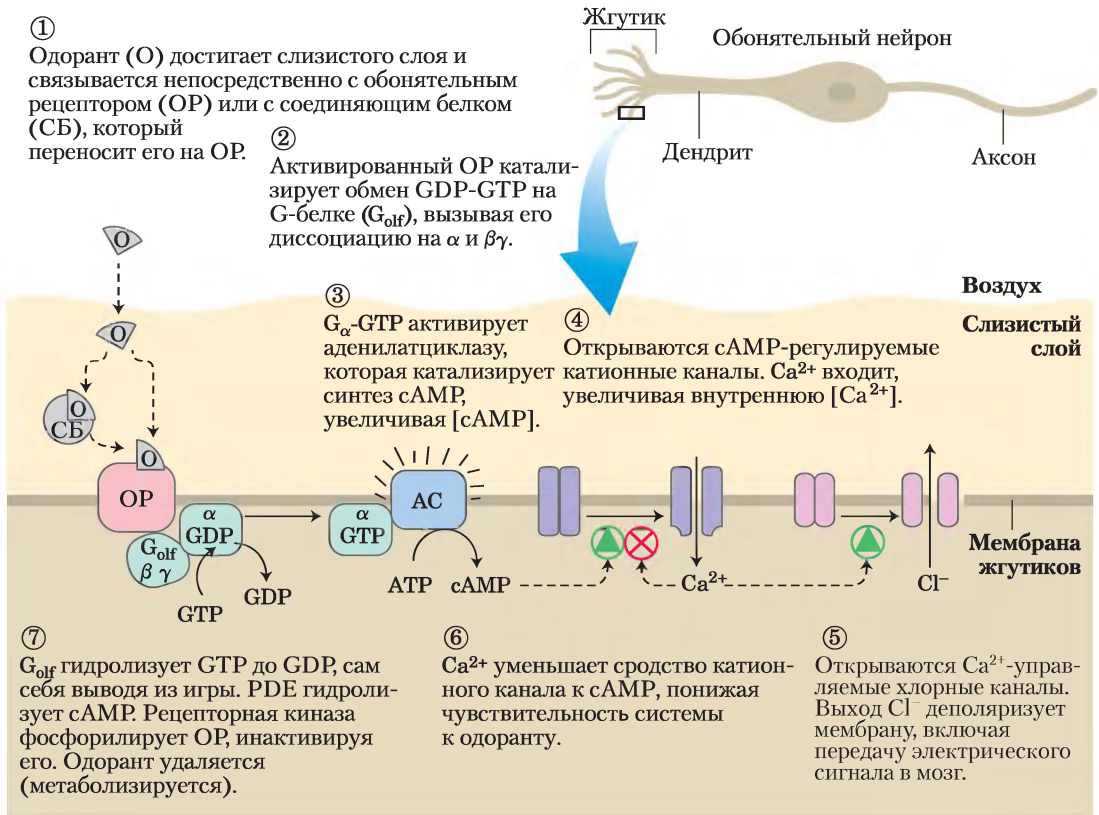


Рис. 12-40. Молекулярный механизм восприятия запахов. Эти взаимодействия происходят в жгутиках обонятельных рецепторных клеток.

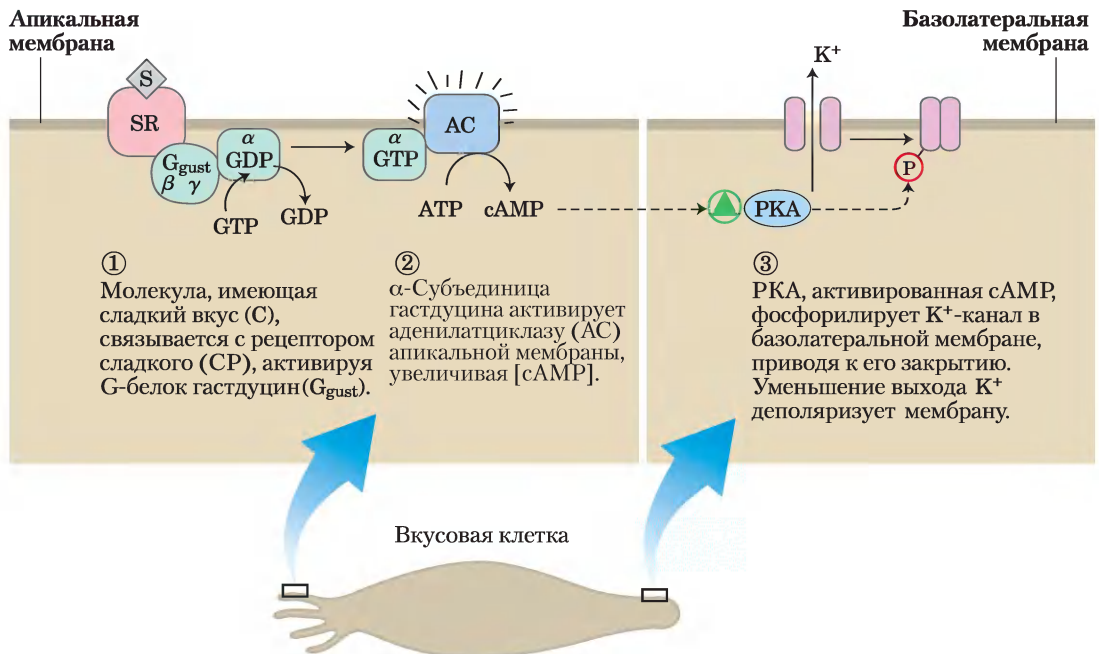


Рис. 12-41. Механизм передачи вкусового сигнала от сладких веществ.

GPCR сенсорных систем и гормональной сигнализации имеют общие свойства

Мы рассмотрели четыре системы передачи сигналов (гормональная сигнализация, зрение, обоняние, вкус), в которых мембранные рецепторы посредством G-белков сопряжены с ферментами, генерирующими вторичные мессенджеры. Очевидно, что сигнальные механизмы возникли на ранних стадиях эволюции; при исследованиях геномов было обнаружено несколько сотен генов, кодирующих GPCR у позвоночных, членистоногих (у дрозофилы и комара) и круглого червя *Caenorhabditis elegans*. Даже обычные пивные дрожжи р. *Saccaromyces* используют GPCR и G-белки для обнаружения клеток другого пола при спаривании. Основные структуры стали консервативными, а модификации дали новым организмам способность реагировать на множество стимулов (табл. 12-8). В геноме человека из почти 29 000 генов 1000 генов кодируют GPCR, включая сотни рецепторов к обонятельным стимулам, а также «сиротские» рецепторы, для которых природные лиганды пока неизвестны.

Все хорошо изученные системы передачи сигнала, которые действуют посредством гетеротримерных G-белков, имеют некоторые общие особенности (рис. 12-42). Рецепторы содержат семь трансмембранных сегментов, домен (обычно петля между спиралями 6 и 7), взаимодействующий с G-белком, и цитоплазматический домен на C-конце, который подвергается обратимому фосфорилированию по нескольким остатками Ser и

Thr. Лигандсвязывающий центр (или световой рецептор) погружен глубоко в мембрану и включает в себя остатки нескольких трансмембранных сегментов. Связывание лиганда (или поглощение света) индуцирует конформационные изменения в рецепторе, при этом домен, который может взаимодействовать с G-белком, становится доступным. Гетеротримерные G-белки активируют или ингибируют эффекторные ферменты (аденилатциклазу, PDE или PLC), которые изменяют концентрацию вторичного мессенджера (сAMP, сGMP, IP₃ или Ca²⁺). В гормончувствительных системах конечным результатом является активация протеинкиназы, которая регулирует какой-либо клеточный процесс путем фосфорилирования ключевого для этого процесса белка. В сенсорных нейронах другой результат — изменение мембранного потенциала и последующий электрический сигнал, который проходит к другому нейрону на пути, связывающем сенсорную клетку с головным мозгом.

Все сигнальные системы самоинактивируются. Связанный GTP превращается в GDP благодаря присущей G-белкам GTPазной активности, которая часто усиливается активирующими GTPазу белками (GAP от англ. *GTPase-activating proteins*) или **RGS-белками** (англ. *regulators of G-protein signaling*; см. рис. 12-5). В некоторых случаях эффекторные ферменты, которые являются мишенями G-белковой модуляции, также выполняют функцию GAP. Механизм десенсibilизации, включающий фосфорилирование C-концевой области после связывания аррестина, очень распространен, а может быть, и универсален.

Таблица 12-8 Некоторые вещества, передающие сигнал через GPCR

γ-Аминомасляная кислота (ГАМК)	Кальцитонин	Серотонин
АТФ (внеклеточный)	Каннабиноиды	Соматостатин
Аденозин	Катехоламины	Тиротропин
Ангиотензин	Кортикотропин-рилизинг-фактор	Тиротропин-высвобождающий гормон
Ацетилхолин (мускариновый рецептор)	Лейкотриены	Фактор активации тромбоцитов
Брадикинин	Лютеинизирующий гормон (ЛГ)	Фактор, высвобождающий гормон роста
Вазоактивный кишечный пептид	Мелатонин	Факторы, определяющие типы спаривания у дрожжей
Вазопрессин	Обонятельные стимулы	Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)
Вкусовые стимулы	Опиоиды	Холецистокинин
Гистамин	Окситоцин	Циклический АМР (<i>Dictyostelium discoideum</i>)
Глутамат	Простагландины	
Глюкагон	Свет	
Дофамин	Секретин	

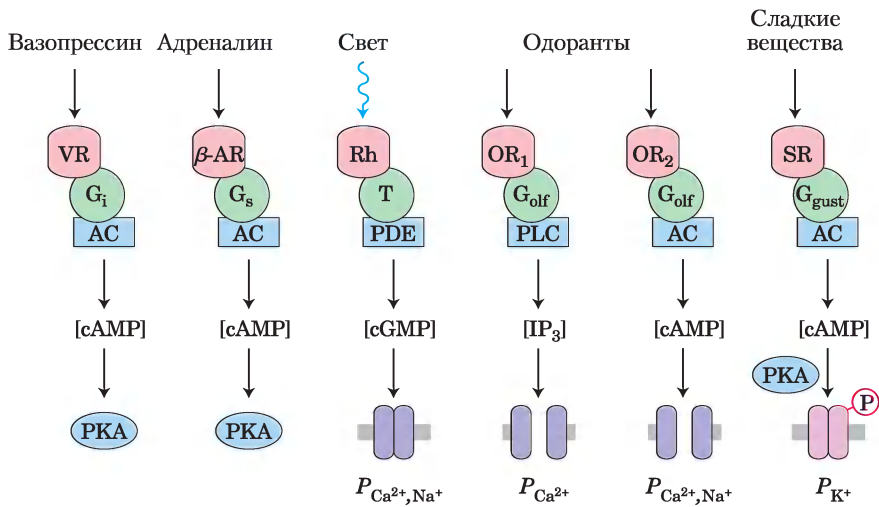


Рис. 12-42. Общие свойства сигнальных систем, отвечающих на гормоны, свет, запахи и вкусы. GPCR обеспечивают специфичность сигнала, а их взаимодействие с G-белками обеспечивает его усиление. Гетеротримерные G-белки активируют эффекторные ферменты: аденилатциклазу (AC), фосфолипазу C (PLC) и фосфодиэстеразы (PDE), разлагающие cAMP или cGMP. Изменения концентрации вторичных мессенджеров (cAMP, cGMP, IP_3) приводят к изменениям ферментативной активности при фосфорилировании или к изменениям проницаемости (P) поверхностных мембран для Ca^{2+} , Na^+ и K^+ . Происходящая в результате деполяризация или гиперполяризация мембраны сенсорной клетки (сигнал) передается через соединительные нейроны к сенсорным центрам в головном мозге. Для хорошо изученных систем установлено, что десенсibilизация включает в себя фосфорилирование рецептора и связывание белка (аррестина), который прерывает взаимодействие рецептора с G-белком. VR — рецептор вазопрессина, β -AR — β -адренергический рецептор. Другие сокращения для рецепторов и G-белков те же, что и ранее.

Краткое содержание раздела 12.10 СЕНСОРНАЯ ПЕРЕДАЧА СИГНАЛА В ПРОЦЕССАХ ЗРЕНИЯ, ОБОНЯНИЯ И ВКУСА

- Зрение, обоняние и вкус у позвоночных обеспечиваются GPCR, использующими гетеротримерные G-белки для изменения мембранного потенциала V_m сенсорного нейрона.
- В палочках и колбочках сетчатки свет активирует родопсин, который стимулирует превращение GDP в GTP в G-белке трансдукции. Свободная α -субъединица трансдукции активирует cGMP-фосфодиэстеразу, которая понижает концентрацию cGMP и вследствие этого закрывает cGMP-зависимые ионные каналы в наружном сегменте нейрона. В результате происходит гиперполяризация мембраны клеток палочек или колбочек и сигнал передается

на следующий нейрон сигнального пути и в итоге поступает в головной мозг.

- В обонятельных нейронах стимулы запускают, действуя через GPCR и G-белки, либо увеличение концентрации cAMP (активируя аденилатциклазу), либо увеличение содержания Ca^{2+} (путем активации фосфолипазы C). Эти вторичные мессенджеры действуют на ионные каналы и соответственно на V_m .
- Вкусковые нейроны содержат GPCR, которые реагируют на вкусовые вещества путем изменения концентрации cAMP, что в свою очередь влияет на V_m , регулируя (открывая или закрывая) ионные каналы.
- У разных видов наблюдается высокая консервативность в наборе сигнальных белков и механизмах передачи сигналов.

12.11. Регуляция клеточного цикла протеинкиназами

Одна из самых существенных функций фосфорилирования белков у эукариот заключается в регуляции клеточного цикла. Во время роста эмбриона и на стадиях более позднего развития клеточное деление происходит практически во всех тканях. Во взрослом организме большинство тканей находятся в состоянии покоя. «Решение» клетки делиться или не делиться имеет принципиальное значение для организма. Когда регуляторные механизмы, которые ограничивают клеточное деление, повреждены, клетка начинает бесконтрольно делиться, это приводит к катастрофическому результату — раку. Нормальное клеточное деление требует происходящих в строго определенном порядке биохимических стадий, гарантированно обеспечивающих каждую дочернюю клетку полным комплектом молекул, необходимых для жизни. Исследования регуляции клеточного деления в разных эукариотических клетках позволили выявить универсальные регуляторные механизмы. Сигнальные механизмы, подобные рассмотренным выше, играют ключевую роль в определении того, будет ли клетка делиться и когда это произойдет, а также обеспечивают правильный порядок прохождения стадий клеточного цикла.

Клеточный цикл протекает в четыре стадии

У эукариот клеточное деление проходит четыре хорошо изученные фазы (рис. 12-43). В фазе S (синтез) ДНК реплицируется, образуя две копии для обеих дочерних клеток. В фазе G₂ (G от англ. *gap* — промежуток между делениями) синтезируются новые белки, и клетка увеличивается в размере примерно вдвое. В стадии M (митоз), разрушается ядерная оболочка материнской клетки, парные хромосомы оттягиваются к противоположным полюсам клетки, каждый набор дочерних хромосом окружается вновь образованной ядерной оболочкой; в процессе цитокинеза клетка пережимается пополам, образуя две дочерние клетки (см. рис. 24-25). В эмбриональной или быстро пролиферирующей ткани каждая дочерняя клетка снова делится, но только после периода ожидания (G₁). В культурах тканей животных клеток весь процесс занимает около 24 ч.

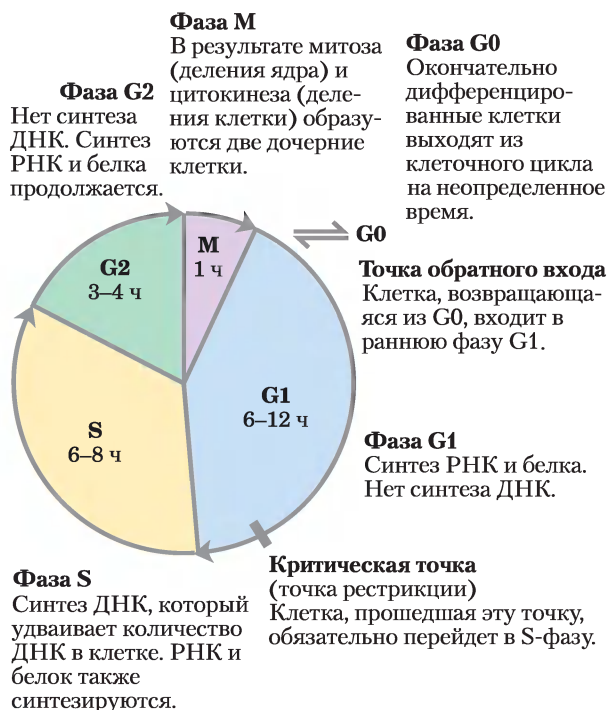


Рис. 12-43. Клеточный цикл у эукариот. Продолжительность (в часах) четырех фаз варьирует, но приведенные здесь времена типичны.

После прохождения стадий митоза и G₁ клетка либо продолжает следовать по циклу, вступая в следующее деление, либо прекращает делиться, оставаясь в фазе покоя (G₀), которая может длиться часы, дни или все время жизни клетки. Когда находящаяся в фазе G₀ клетка снова начинает делиться, она снова вступает в цикл в фазе G₁. Дифференцированные клетки, такие как гепатоциты или адипоциты, уже приобрели свою специфическую форму и функцию; они остаются в фазе G₀. Стволовые клетки сохраняют способность к делению и к дифференцировке в любые среды определенных типов клеток.

Уровень циклинзависимых протеинкиназ осциллирует (колеблется)

Регуляция клеточного цикла во времени осуществляется семейством протеинкиназ, активность которых изменяется в ответ на клеточные сигналы. Фосфорилируя специфические белки в точно

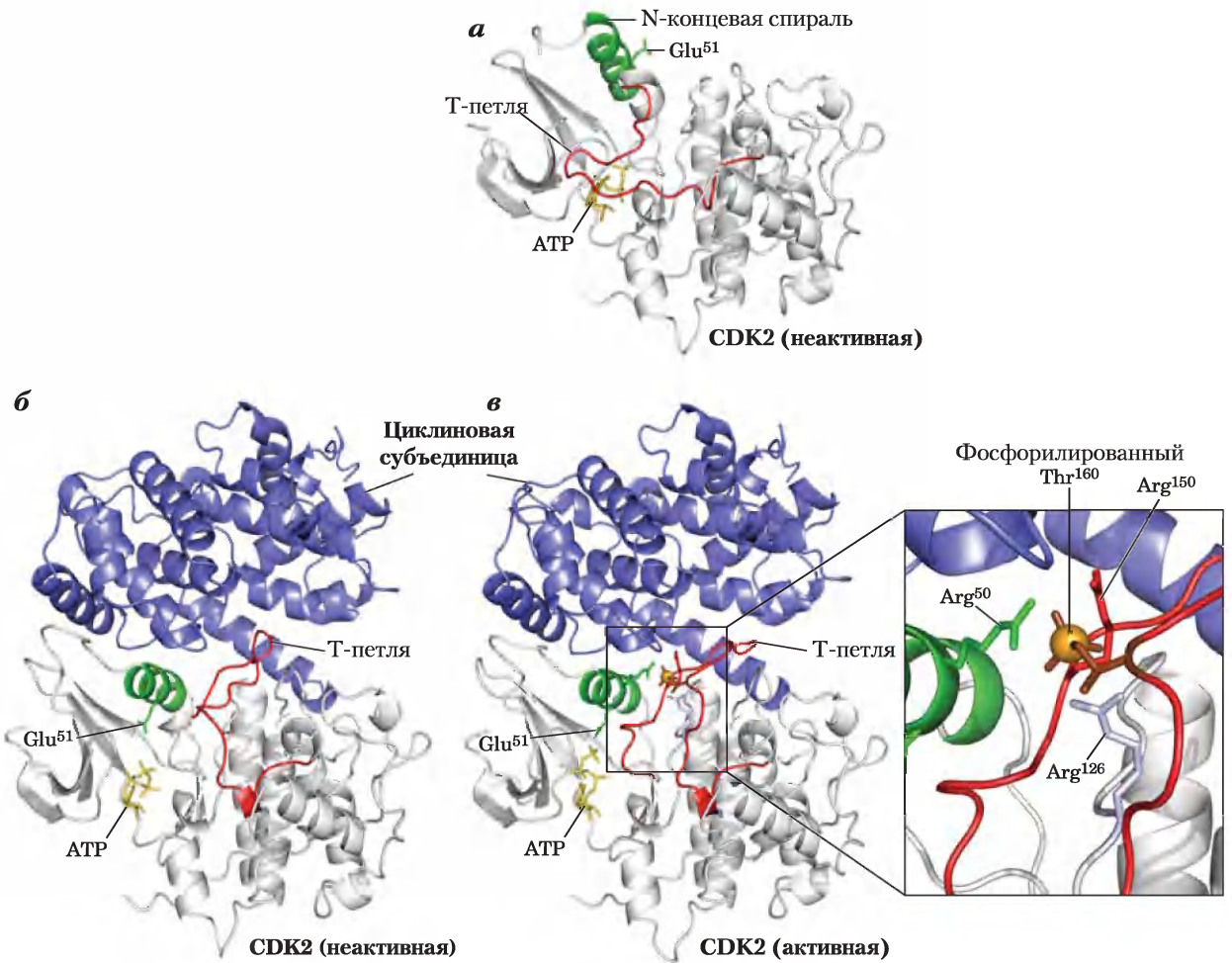


Рис. 12-44. Активация циклинзависимых протеинкиназ (CDK) циклином и фосфорилирование. CDK (циклинзависимые протеинкиназы) — семейство родственных ферментов; они активны, только если связаны с циклинами — белками другого семейства. Кристаллическая структура CDK2, связанной и не связанной с циклином, показывает, что необходимо для этой активации. *а*) Без циклина (PDB ID 1 HCK) CDK2 укладывается таким образом, что один ее сегмент (Т-петля) заслоняет участок связывания белковых субстратов и таким образом ингибирует активность протеинкиназы. Участок связывания АТФ также находится вблизи Т-петли. *б*) Связывание циклина (PDB ID 1 FIN) вызывает конформационные изменения, отодвигающие Т-петлю от активного центра, и переориентирует N-концевую спираль, при этом ключевой для катализа остаток (Glu⁵¹) переносится в активный центр. *в*) При фосфорилировании остатка Thr в Т-петле на нем возникает отрицательный заряд; структура стабилизируется взаимодействием с тремя остатками Arg, удерживая CDK в активной конформации (PDB ID 1JST).

определенные моменты времени, эти протеинкиназы управляют в клетке метаболическими процессами, обеспечивающими клеточное деление. Эти киназы являются гетеротримерами, содержащими регуляторную субъединицу **циклин** и каталитическую субъединицу — **циклинзависимую**

протеинкиназу (CDK — от англ. *cyclin-dependent protein kinase*). В отсутствие циклина каталитическая субъединица практически неактивна. Когда циклин присоединяется, открывается каталитический центр и становится доступным для катализа аминокислотный остаток (рис. 12-44),

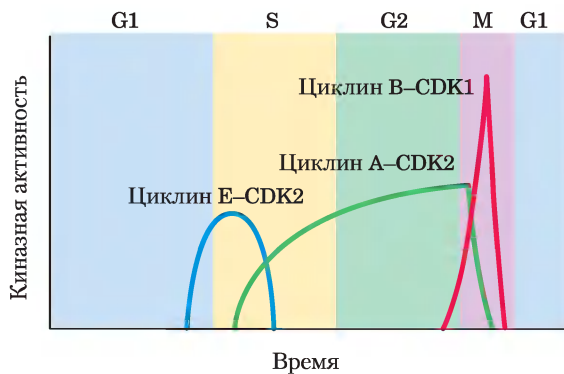


Рис. 12-45. Колебания активности специфических CD-киназ в клеточном цикле у животных. Активность циклиновой E-CDK2 достигает пика вблизи границы фаз G1 и S, когда активный фермент запускает синтез ферментов, необходимых для синтеза ДНК (см. рис. 12-48). Активность циклиновой A-CDK2 возрастает в фазах S и G2, затем резко падает в фазе M, когда наблюдается пик активности циклиновой B-CDK1.

а активность каталитической субъединицы возрастает в 10 000 раз. В клетках животных по крайней мере 10 различных циклинов (обозначаемых A, B и т. д.) и как минимум восемь циклинзависимых протеинкиназ (CDK1–CDK8), которые работают в различных комбинациях на соответствующих фазах клеточного цикла. Растения также используют семейство CDK для регуляции деления клеток меристемы корней и побегов — основных тканей, в которых происходит деление.

В популяции животных клеток при синхронном делении наблюдаются колебания (осцилляции) активности некоторых CDK (рис. 12-45). Эти колебания являются результатом регуляции активности CDK: фосфорилирования или дефосфорилирования CDK, контролируемой деградации циклиновой субъединицы, периодического синтеза CD-киназ и циклинов и действия специфических, ингибирующих CDK белков. Обычно активные CDK позволяют клетке войти в определенную стадию клеточного цикла.

Регуляция CD-киназ посредством фосфорилирования. Активность CDK очень сильно зависит от фосфорилирования и дефосфорилирования двух ключевых остатков в белке (рис. 12-46, а). Фосфорилирование Thr¹⁵ вблизи N-конца делает CDK2 неактивной, поскольку остаток P-Thr находится в АТР-связывающем центре киназы

и отрицательно заряженная фосфатная группа блокирует вход АТР. Специфическая фосфатаза дефосфорилирует этот фосфотиозиновый остаток, обеспечивая связывание АТР. Фосфорилирование Thr¹⁶⁰ в T-петле CDK, катализируемое CDK-активирующей киназой, вытесняет T-петлю из субстратсвязывающей щели, делая возможными связывание субстрата и проявление каталитической активности (рис. 12-44, в).

Одним из стимулов, запускающих этот механизм регуляции, является наличие одностранных разрывов ДНК, которые приводят к остановке клеточного цикла в фазе G2. Специфическая протеинкиназа (у дрожжей называется Rad3), активируемая одностранными разрывами, запускает каскад, ведущий к инактивации фосфатазы, которая дефосфорилирует Tyr¹⁵ в CDK. CD-киназа остается неактивной, и клетка останавливается в фазе G2. Клетка не делится до тех пор, пока ДНК не восстановится и результаты действия каскада не окажутся повернуты вспять.

Контролируемая деградация циклина. На протяжении клеточного цикла активность CDK регулирует высокоспецифический и рассчитанный во времени протеолитический распад митотических циклинов. Прохождение через митоз требует сначала активации, а потом деструкции циклинов A и B, которые активируют каталитическую субъединицу, действующую в фазе M. Эти циклины содержат вблизи N-конца последовательность Arg-Thr-Ala-Leu-Gly-Ile-Gly-Asn — «блок деструкции», который делает циклины мишенью для деградации. (Термин «блок» (от англ. *box*) заимствован из общей практики представления последовательности нуклеиновой кислоты или белка в виде диаграммы, на которой в блок выделяют короткую последовательность нуклеотидных или аминокислотных остатков, обладающих некоторой специфической функцией; при этом не подразумевается никакой трехмерной структуры.) Белок DBRP (от англ. *destruction box recognizing protein*) узнает эту последовательность и инициирует процесс деградации циклина, соединяя вместе циклин и белок убиквитин. Циклин и активированный убиквитин образуют ковалентные связи под действием фермента убиквитинлигазы (рис. 12-44, б). Затем присоединяются несколько дополнительных молекул убиквитина, давая сигнал про-

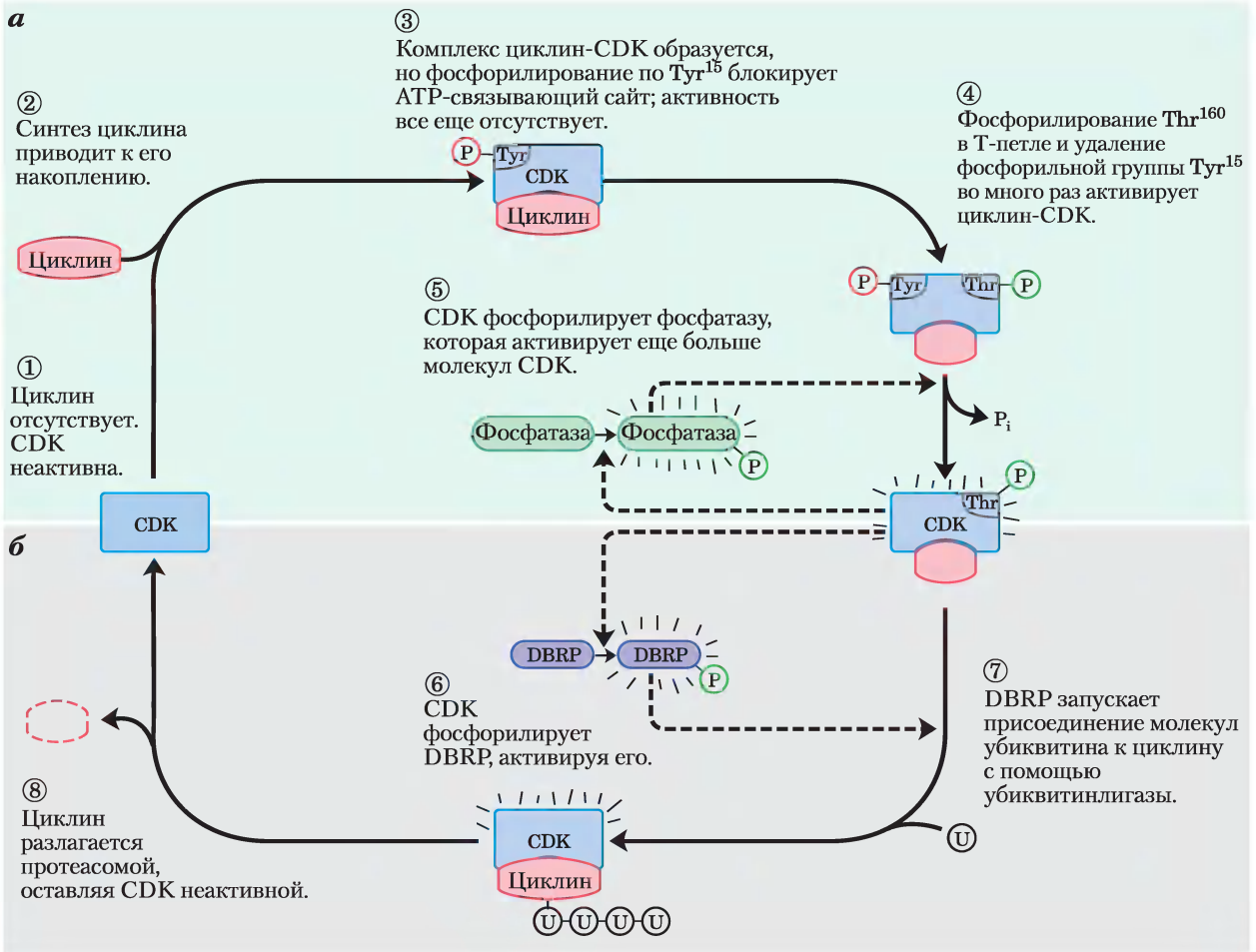


Рис. 12-46. Регуляция CDK путем фосфорилирования и протеолиза. а) Циклинзависимая протеинкиназа (CDK), активированная во время митоза (фаза М), содержит Т-петлю, которая укладывается в субстратсвязывающий сайт. Когда Thr^{160} в Т-петле фосфорилируется, петля выдвигается из субстратсвязывающего центра, многократно активируя CDK (стадия ④). б) Активный комплекс циклин-CDK запускает процесс самоинaktivации путем фосфорилирования DBRP (белка, распознающего блок деструкции; стадия ⑥). Затем DBRP и убиквитинлигаза присоединяют несколько молекул убиквитина (U) к циклину (стадия ⑦), делая его мишенью деструкции протеасомами — протеолитическими ферментными комплексами (стадия ⑧).

теолитическому ферментному комплексу, или **протеасоме**, деградировать циклин.

Как регулируется время разрушения циклина? Цепь обратной связи прослеживается для всего процесса, изображенного на рис. 12-46. Увеличение активности CDK активирует протеолиз циклина. Вновь синтезированный циклин связывается с CDK и активирует ее. CD-киназа фосфорилирует и активирует DBRP, активный DBRP вызывает протеолиз циклина. Пониженная концентрация циклина вызывает падение активно-

сти CDK, а активность DBRP также уменьшается в результате медленного непрерывного дефосфорилирования и инактивации посредством DBRP-фосфатазы. Наконец, путем синтеза новых молекул циклина уровень восстанавливается.

Роль убиквитина и протеасом не ограничивается регуляцией уровня циклина; как мы увидим в гл. 27, они принимают участие в метаболизме и обновлении клеточных белков — процессах, фундаментальных для поддержания жизненно важных клеточных функций.

Регулируемый синтез CDK и циклинов. Третий механизм изменения активности CDK заключается в регуляции скорости синтеза циклина и (или) CDK.

Например, циклин D, циклин E, CDK2 и CDK4 синтезируются, только когда в ядре присутствует специфический фактор транскрипции E2F, активирующий транскрипцию соответствующих генов. Синтез E2F в свою очередь регулируется внеклеточными сигналами, такими как **факторы роста** и цитокины (индукторы клеточного деления); наличие этих веществ обязательно для деления клеток млекопитающих в культуре. Эти ростовые факторы индуцируют синтез специфических ядерных факторов транскрипции, необходимых при продуцировании ферментов для синтеза ДНК. Факторы роста запускают фосфорилирование ядерных белков

Jun и Fos — факторов транскрипции, которые способствуют синтезу продуктов большого числа генов, в том числе циклинов, CD-киназ и E2F. В свою очередь E2F регулирует продукцию нескольких ферментов, необходимых для синтеза дезоксирибонуклеотидов и ДНК, способствуя переходу клетки в фазу S (рис. 12-47).

Ингибирование CDK. Наконец, специфические белковые ингибиторы связываются со специфическими CDK и инактивируют их. Одним из таких белков является p21, который мы опишем ниже.

Эти четыре регуляторных механизма модулируют активность специфических CDK, которые в свою очередь определяют, будет ли клетка делиться либо дифференцироваться, постоянно находясь в состоянии покоя или же после периода покоя начнет новый цикл. Детали регуляции клеточного цикла (число различных циклинов, киназ и их комбинаций) отличаются от вида к виду, но общий механизм в основном сложился и сохранился в процессе эволюции всех эукариотических клеток.

CDK регулируют клеточное деление путем фосфорилирования важных белков

Мы увидели, что клетки обеспечивают строгий контроль активности CDK. Но как активность CDK регулирует клеточный цикл? Список белков, известных как мишени действия CDK, продолжает расти, и еще многое предстоит узнать. Тем не менее мы можем представить себе общий механизм регуляции CDK, проследив действие CDK на строение ламинина и миозина и на активность белка ретинобластомы.

Структура ядерной оболочки частично поддерживается высокоорганизованными сетями промежуточных филаментов, состоящих из белка ламинина. Разрушение ядерной оболочки перед расхождением сестринских хроматид в митозе в какой-то мере обусловлено фосфорилированием ламинина посредством CDK, которое заставляет ламининовые филаменты деполимеризоваться.

Второй мишенью киназы является приводимая в действие с помощью АТФ актомиозиновая сократительная система, которая пережи-

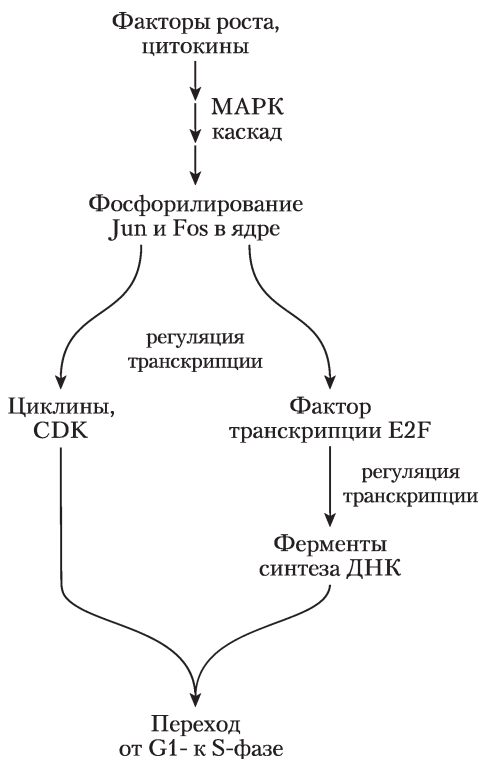


Рис. 12-47. Регуляция клеточного деления факторами роста. Путь от ростовых факторов к клеточному делению проходит через ферментативный каскад, который активирует каскад MAPK, фосфорилирование ядерных факторов транскрипции Jun и Fos и активность фактора транскрипции E2F, который способствует синтезу нескольких ферментов, необходимых для синтеза ДНК.

мает делящуюся клетку, разделяя ее в процессе цитокинеза на две равные части. После деления клетки CD-киназа фосфорилирует небольшую регуляторную субъединицу миозина, вызывая отделение миозина от актиновых филаментов и инактивируя сократительный механизм. Последующее дефосфорилирование позволяет вновь осуществить сборку сократительного аппарата для следующего раунда цитокинеза.

Третьим и очень важным субстратом CDK является **белок ретинобластомы pRb**. Когда обнаруживается повреждение ДНК, этот белок участвует в механизме остановки деления клетки в фазе G1 (рис. 12-48). Название этого белка происходит от клеточной линии опухоли сетчатки, где он был открыт. Белок pRb функционирует если не во всех, то в большинстве клеток, регулируя клеточное деление в ответ на множество стимулов. Нефосфорилированный pRb связывается с фактором транскрипции E2F; в этом состоянии pRb E2F не может стимулировать транскрипцию группы генов, необходимых для синтеза ДНК (гены ДНК-полимеразы α , рибонуклеотидредуктазы и других белков; гл. 25). Теперь клеточный цикл не может продвигаться от фазы G1 до фазы S, которая вводит клетку в митоз и деление. Механизм, блокирующий pRb-E2F, выключается, когда pRb фосфорилируется циклиновой киназой E-CDK2, которая появляется в ответ на сигнал к клеточному делению.

Когда протеинкиназы ATM и ATR обнаруживают повреждение ДНК, например односторонний разрыв, они активируют p53, который играет роль фактора транскрипции, стимулирующего синтез белка p21 (рис. 12-48). Этот белок ингибирует протеинкиназную активность циклиновой киназы E-CDK2. В присутствии p21 белок pRb остается в нефосфорилированном состоянии и связан с E2F, активность фактора транскрипции блокируется, и клеточный цикл останавливается в фазе G1. Это дает клетке время для восстановления поврежденной ДНК перед вступлением в фазу S. Тем самым предотвращается губительный перенос поврежденного генома в одну или обе дочерние клетки. Если повреждение слишком серьезное, чтобы его можно было эффективно репарировать, тот же механизм запускает процесс апоптоза, описанный ниже, который приводит к гибели клетки, предотвращая возможное развитие рака.

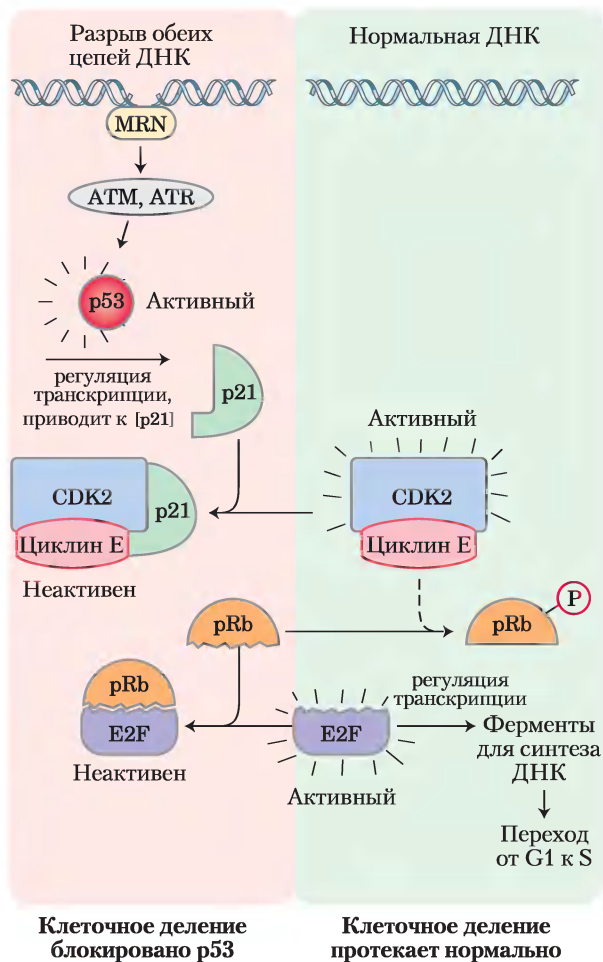


Рис. 12-48. Регуляция перехода от фазы G1 к фазе S путем фосфорилирования pRb. Фактор транскрипции E2F стимулирует транскрипцию генов некоторых ферментов, необходимых для синтеза ДНК. Белок ретинобластомы pRb может связывать фактор E2F (внизу слева), инактивируя его и предотвращая транскрипцию таких генов. Фосфорилирование pRb под действием CDK2 предотвращает связывание и инактивацию E2F, так что гены продолжают транскрибироваться, а клетки делятся. Повреждение ДНК (вверху слева) запускает серию событий, приводящих к инактивации CDK2, в результате чего деление клетки прекращается. Когда белок MRN обнаруживает повреждение ДНК, он активирует две протеинкиназы ATM и ATR, которые фосфорилируют и активируют транскрипционный фактор p53. Активный p53 стимулирует синтез белка p21 — ингибитора CDK2. Ингибирование CDK2 останавливает фосфорилирование pRb, который, следовательно, продолжает связывать и ингибировать E2F. При инактивации E2F необходимые для деления клетки гены не транскрибируются, и деление клетки останавливается. После репарации ДНК перечисленные события разворачиваются в обратном направлении, и клетка начинает делиться.

Краткое содержание раздела 12.11

РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

ПРОТЕИНКИНАЗАМИ

- Продвижение по клеточному циклу регулируется циклинзависимыми протеинкиназами (CDK), которые действуют в специфических точках цикла, фосфорилируя ключевые белки и модулируя их активность. Каталитическая субъединица CDK неактивна, если не связана с регуляторной циклиновой субъединицей.
- Активность комплекса циклин–CDK изменяется в процессе клеточного цикла посредством синтеза CDK, специфической дегградации циклина, фосфорилирования и дефосфорилирования ключевых остатков в CDK и связывания ингибиторных белков со специфическими комплексами циклин–CDK.

12.12. Онкогены, гены опухолевых супрессоров и программируемая гибель клетки

Доброкачественные и злокачественные опухоли возникают в результате неконтролируемого клеточного деления. В норме деление клеток регулирует семейство внеклеточных ростовых факторов — белков, которые заставляют покоящиеся клетки делиться и в некоторых случаях дифференцироваться. В результате устанавливается баланс между образованием новых клеток и разрушением старых (клетки кожи отмирают и заменяются новыми каждые несколько недель; лейкоциты заменяются на новые через несколько дней после образования). Если из-за дефектов регуляторных белков баланс между старыми и новыми клетками нарушается, может возникнуть клон клеток, деление которых не поддается регуляции (опухоль), а в какой-то момент их присутствие начинает мешать функционированию нормальных тканей (злокачественная опухоль, или рак). Непосредственной причиной возникновения рака почти всегда является генетический дефект одного или нескольких белков, регулирующих деление клеток. Иногда дефектный ген наследуется от одного из родителей; в других слу-

чаях мутация происходит в результате действия токсичного вещества (мутагена или канцерогена) или проникающей радиации на ДНК единственной клетки. В большинстве случаев действуют как наследственные факторы, так и факторы окружающей среды; кроме того, в большинстве случаев для полного нарушения регуляции деления клеток и развития рака требуется несколько мутаций. Нарушения в синтезе, регуляции или распознавании факторов роста могут привести к развитию рака.

Онкогены — это мутантные формы генов белков, регулирующих клеточный цикл



Онкогены первоначально были открыты в вирусах, вызывающих опухоли. Позже было обнаружено, что они очень близки генам (а может быть, и произошли от них) клеток животных — **протоонкогенам**, которые кодируют белки, регулирующие рост. В процессе вирусной инфекции последовательность ДНК протоонкогена иногда копируется вирусом и внедряется в его геном. В определенный момент развития вирусной инфекции ген может стать дефектным в результате укорачивания или мутации. У вирусов, в отличие от животных клеток, нет эффективных механизмов исправления ошибок во время репликации ДНК, поэтому мутации у них быстро накапливаются. Когда вирус, несущий онкоген, заражает клетку хозяина, вирусная ДНК (и онкоген) включается в ДНК клетки хозяина, где теперь может влиять на регуляцию деления. По альтернативному не-вирусному механизму в отдельной клетке ткани, подвергшейся действию канцерогенов, может повредиться ДНК, что приводит к образованию дефекта в одном из регуляторных белков. Далее тот же онкогенный эффект: нарушение регуляции клеточного деления.

Мутации, продуцирующие онкогены, являются генетически доминантными; если любая из пар хромосом содержит дефектный ген, продукт этого гена посылает сигнал деления; результат этого — развитие опухоли. Онкогенный дефект может быть в любом из белков, участвующих в передаче сигнала деления. Известны онкогены, которые кодируют секретлируемые белки, факторы роста, трансмембранные белки (рецепторы), цитоплазматические белки (G-белки и протеинкиназы) и ядерные факторы транскрипции, кон-

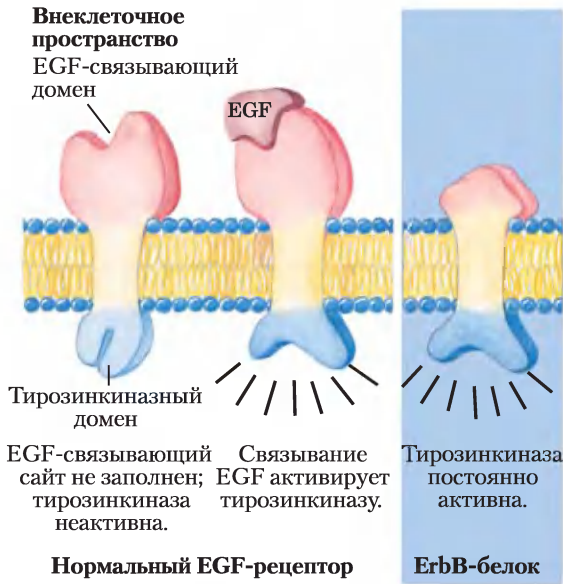


Рис. 12-49. Кодлируемый онкогеном дефектный EGF-рецептор. Продукт онкогена *erbB* (белок ErbB) представляет собой «урезанный вариант» нормального рецептора эпидермального фактора роста (EGF). Его внутриклеточный домен имеет структуру, которая в норме создается при связывании с EGF, но данному белку недостает внеклеточного центра связывания EGF. Без регуляции со стороны EGF белок ErbB непрерывно подает сигнал клеточного деления.

тролирующие экспрессию генов, необходимых для клеточного деления (Jun, Fos).

Некоторые онкогены кодируют поверхностные рецепторы с дефектными или отсутствующими участками связывания сигнальных веществ, например такие, у которых не регулируется тирозинкиназная активность. Так, белок ErbB по существу идентичен нормальному

Дополнение 12-5



МЕДИЦИНА

Разработка противоопухолевых лекарственных препаратов на основе ингибиторов протеинкиназ

Если отдельная клетка начинает делиться без какой-либо регуляции и ограничений, это неизбежно приведет к появлению столь значительного клона клеток, что они будут мешать выполнению нормальных физиологических функций организма (рис. 1). Это и есть рак — основная причина смертности в развитых странах; и эта причина смертности скоро станет основной и в развивающихся странах. При любом типе рака нормальная регуляция деления клетки нарушается



Рис. 1. Нарушение регуляции одной-единственной клетки толстой кишки приводит к развитию первичной раковой опухоли с метастазами в печень. При вскрытии выявлены вторичные опухоли — белые вкрапления в ткани печени.

из-за дефекта одного или нескольких генов. Например, гены белков, в норме периодически посылающих клеткам сигнал к делению, становятся онкогенами, кодирующими конститутивно активные сигнальные белки. А если мутируют гены белков, останавливающих деление клеток (гены опухолевых супрессоров), образуются белки, не выполняющие этой ограничительной функции. Во многих типах рака обнаруживаются оба варианта мутаций.

Многие онкогены и гены опухолевых супрессоров кодируют протеинкиназы или белки, действующие в сигнальных путях перед протеинкиназами. В связи с этим можно надеяться, что специфические ингибиторы протеинкиназ окажутся полезными для лечения опухолевых заболеваний. Например, мутантная форма рецептора EGF представляет собой постоянно активированную рецепторную тирозинкиназу (RTK), передающую клеткам сигнал к делению вне зависимости от наличия EGF (см. рис. 12-49). Приблизительно у 30% женщин с метастазирующим раком груди в результате мутации гена рецептора HER2/*neu* образуется RTK с активностью, которая в 100 раз превышает норму. Для образования новых кровеносных сосудов (ангиогенез), чтобы обеспечить солидную опухоль кровью, должна быть активирована еще одна RTK — **рецептор фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF-R)**,



так что ингибирование VEGF-R может оставить опухоль без необходимых для ее развития питательных веществ. Нерцепторные тирозинкиназы также могут мутировать, что приводит к постоянной передаче сигнала и нарушению регуляции клеточного деления. Например, онкоген *Abl* (от англ. *Abelson leukemia*) связан с развитием острого миелоидного лейкоза — сравнительно редкого заболевания крови (в США около 5000 случаев в год). Онкогены, относящиеся к другой группе, кодируют циклинзависимые протеинкиназы, не поддающиеся регуляции. В каждом из названных выше случаев специфический ингибитор протеинкиназы мог бы оказаться очень ценным лекарственным препаратом для химиотерапевтического лечения заболевания. Поэтому нет ничего удивительного в том, что для создания подобных препаратов прилагаются колоссальные усилия. Однако как же подойти к решению этой проблемы?

Удивительно, что у всех видов строение активного центра протеинкиназ одинаковое. Вообще все протеинкиназы по строению похожи на РКА (рис. 1): вокруг активного центра расположены две части (доли) молекулы; имеется Р-петля, в которой через свои фосфаты может связаться АТФ; активирующая петля может менять свое положение так, что активный центр становится доступным для белка-субстрата; а при активации фермента его С-спираль формирует карман, аминокислотные остатки которого занимают удобные для связывания субстрата позиции.

Простейшие ингибиторы протеинкиназ — это аналоги АТФ, которые занимают АТФ-связывающий центр, но не могут служить донорами фосфатных групп. Известно множество подобных веществ, однако их клиническое применение ограничено из-за отсутствия селективности: они ингибируют практически любые протеинкиназы, так что оказываемое ими побочное действие не позволяет использовать их в качестве лекарственных средств. Большой селективностью обладают вещества, молекулы которых занимают лишь часть АТФ-связывающего центра, а за его пределами вступают во взаимодействие с участками белков, уникальными для той протеинкиназы, действие которой нужно заблокировать. Третья возможная стратегия основана на том факте, что, хотя активные конформации всех протеинкиназ одинаковы, их неактивные конформа-

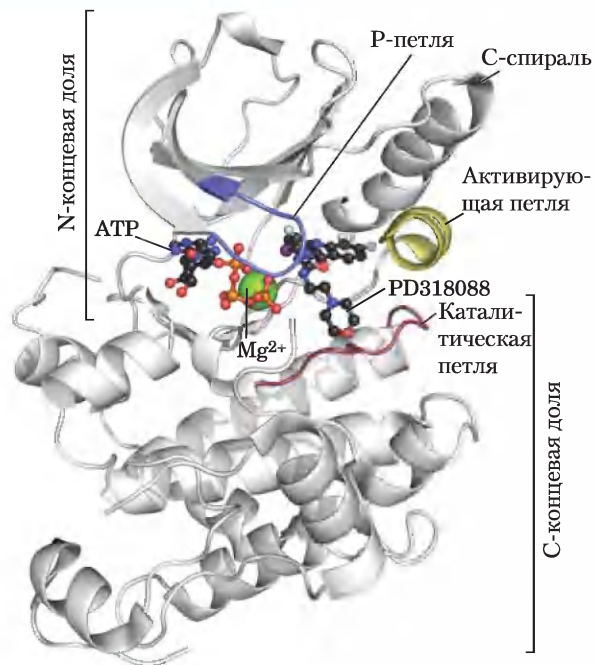


Рис. 2. Строение активного центра протеинкиназ (PDB ID 1S9I). Активный центр зажат между N-концевой и С-концевой областями (долями) фермента; в этом белке есть каталитическая петля и присутствует связанная молекула АТФ. Активирующая петля этой и других протеинкиназ подвергается фосфорилированию, а затем перемещается, открывая субстратсвязывающий карман активного центра (здесь занятый специфическим ингибитором этого фермента — Р318088). Для проявления протеинкиназной активности необходимо связать АТФ в Р- или С-петле, которая должна для этого занять правильное расположение.

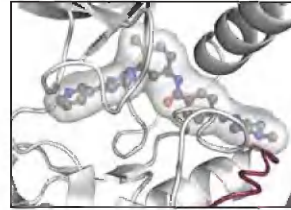
ции различаются. Лекарственные препараты, взаимодействующие со специфической протеинкиназой в неактивной конформации и предотвращающие ее переход в активную форму, проявляют высокую специфичность. Четвертый подход к решению проблемы основан на использовании специфических антител. Например, моноклональные антитела (с. 254), связывающиеся с внеклеточным участком специфических рецепторных тирозинкиназ, способны уничтожать протеинкиназную активность рецепторов, предотвращая димеризацию или удаляя рецепторы с поверхности клетки. В некоторых случаях антитела, селективно связывающиеся на поверхности клеток

опухоли, заставляют иммунную систему атаковать эти клетки.

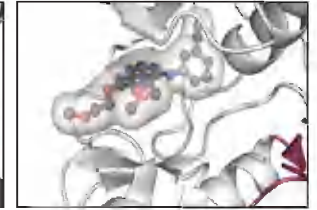
В период между 1998 г. и серединой 2006 г. в США к применению в противоопухолевой терапии было допущено лишь восемь новых лекарственных препаратов: пять малых молекул и три моноклональных антитела, каждое из которых доказало свою эффективность в клинических испытаниях. Например, иматиниб мезилат (гливек; рис. 3, а) — маленькая молекула с ингибирующими свойствами — практически со 100%-й эффективностью вызывает ремиссию у пациентов с хроническим миелолейкозом, обнаруженным на ранней стадии. Эрлотиниб (тарцева; рис. 3, б), взаимодействующий с EGF-R, оказался эффективен на поздних стадиях немелкоклеточного рака легкого. Поскольку во многих системах передачи сигнала, задействованных в делении клеток, принимают участие не одна, а несколько протеинкиназ, для лечения рака могут оказаться полезными те ингибиторы, которые блокируют действие нескольких протеинкиназ. Сунитиниб (сутент) и сорафениб (нексавар) действуют на несколько протеинкиназ, включая VEGF-R и PDGF-R. Эти два препарата применяются для лечения больных с опухолью гастроинтестинальной стромы и прогрессирующим раком почки соответственно. Трастузумаб (герцептин), цетуксимаб (эрбитукс) и бевацизумаб (авастин) — это моноклональные антитела, взаимодействующие соответственно с HER2/неу, EGF-R и VEGF-R; все три препарата применяют для лечения различных типов рака.

Не менее сотни других соединений находятся сейчас на стадии доклинических испытаний. Среди этих препаратов некоторые получены из природных источников, другие — синтетическим путем. Индирубин входит в состав китайского травяного сбора, традиционно применяемого для лечения некоторых вариантов лейкоза; он ингибирует CDK2 и CDK5. Флавопиридол (рис. 3, з) — синтетический аналог алкалоида, выделяемого из коры индийского растения *Amoora rohituka*, является общим ингибитором всех CDK. Сейчас на клинические испытания направляются несколько сотен потенциально противоопухолевых препаратов, и это вселяет надежду на получение более эффективных и более специфичных препаратов, чем те, которыми мы располагаем в настоящий момент.

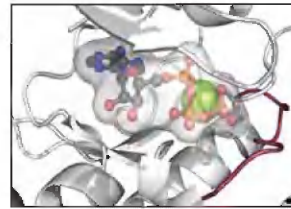
а Иматиниб (гливек) связывается с Abl



б Эрлотиниб (тарцева) связывается с EGF-R



в АТФ связывается с CDK2



г Флавопиридол связывается с CDK2

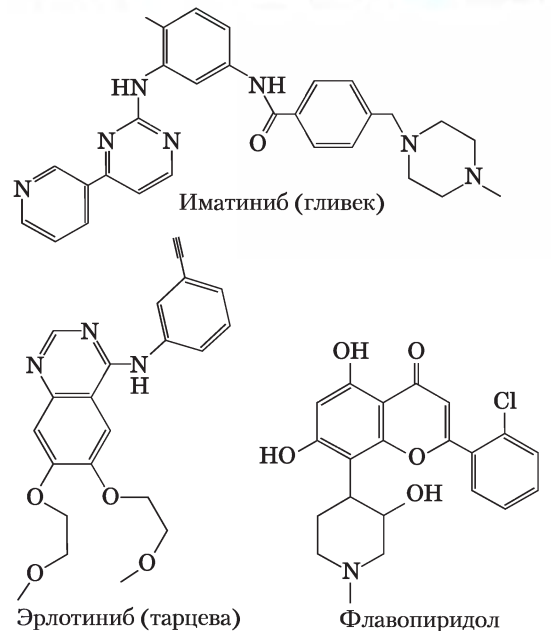



Рис. 3. Взаимодействие некоторых ингибиторов протеинкиназ, проходящих клинические испытания или уже используемых в клинической практике, с белками-мишенями. а) Иматиниб связывается в активном центре онкогенной протеинкиназы Abl (PDB ID 1IEP); он занимает как центр связывания АТФ, так и прилегающий к нему участок. б) Эрлотиниб связывается в активном центре EGF-R (PDB ID 1M17). в и г) Флавопиридол — ингибитор циклинзависимой протеинкиназы CDK2; показано нормальное связывание АТФ (в) в активном центре (PDB ID 1S9I) и связывание флавопиридола (г), препятствующее связыванию АТФ (PDB ID 2A4L).

рецептору эпидермального фактора роста, за исключением того, что у ErbB отсутствует N-концевой домен, в норме связывающий EGF (рис. 12-49); в результате он посылает сигнал деления независимо от того, присутствует рецептор EGF или нет. Мутации в *erbB2*, гене рецепторной Туг-киназы, сходном с ErbB, обычно связаны со злокачественными опухолями железистого эпителия в молочной железе, желудке и яичниках. (По поводу сокращений, использованных в наименованиях генов и их продуктов, см. гл. 25.)

Поскольку протеинкиназы играют ключевую роль в передаче сигнала при нормальном и аномальном делении клетки, именно эти ферменты стали одной из главных мишеней для действия лекарственных препаратов, направленных на лечение опухолевых заболеваний (доп. 12-5). Мутантные формы G-белка Ras часто встречаются в опухолевых клетках. Онкоген *ras* кодирует белок, способный нормально связывать GTP, но не имеющий GTPазной активности. Мутантный белок Ras, таким образом, всегда находится в активированной (связанной с GTP) форме, несмотря на сигналы, поступающие от рецепторов. В результате этого может происходить нерегулируемый рост клеток. Мутациями *ras* обусловлены 30–50% случаев рака легких и толстой кишки и более чем 90% случаев рака поджелудочной железы. ■

Дефекты в генах опухолевых супрессоров приводят к устранению нормальных ограничителей клеточного деления

 Гены опухолевых супрессоров кодируют белки, которые в норме ограничивают клеточное деление. Мутация в одном или нескольких таких генах может приводить к образованию опухоли. Нерегулируемый рост из-за дефектов в генах опухолевых супрессоров, в отличие от нерегулируемого роста, обусловленного онкогенами, имеет рецессивный механизм; опухоли образуются, только если *обе* парные хромосомы содержат дефектный ген. У людей, которые наследуют одну правильную и одну дефектную копию, каждая клетка имеет одну дефектную копию гена. Если любая из 10^{12} соматических клеток подвергнется мутации в одной «хорошей»

копии, из этой дважды мутантной клетки может развиться опухоль. В результате мутаций в обеих копиях генов белков pRb, p53 или p21 возникают клетки, в которых отсутствует нормальный ограничитель клеточного деления, в результате чего развивается опухоль.

Ретинобластома возникает у детей и вызывает слепоту, если ее не лечить хирургически. В клетках ретинобластомы два дефектных аллеля гена *Rb*. Маленькие дети, у которых развивается ретинобластома, обычно имеют множественные опухоли в обоих глазах. Эти дети унаследовали одну дефектную копию гена *Rb*, которая присутствует в каждой клетке; каждая опухоль происходит из единичной клетки сетчатки, в которой произошла мутация одной «хорошей» копии гена *Rb*. (Плод с двумя мутантными аллелями в каждой клетке не выживает.) У людей, у которых в детстве была ретинобластома, высока вероятность возникновения злокачественных опухолей легкого, простаты и молочной железы.

Гораздо менее вероятна ситуация, когда у человека, рожденного с двумя «хорошими» копиями гена, произойдут две независимые мутации в обеих копиях гена *в одной и той же* клетке; тем не менее это случается. У некоторых людей ретинобластома развивается позднее, обычно при этом опухоль бывает только в одном глазу. Эти люди, по-видимому, родились с двумя хорошими копиями (аллелями) *Rb* в каждой клетке, но оба гена *Rb* в одной клетке сетчатки подверглись мутации, приводящей к развитию опухоли. У детей после трех лет клетки сетчатки перестают делиться, так что возникновение ретинобластомы в более позднем возрасте — явление достаточно редкое.

Ответственные за стабильность генома «гены-смотрители» кодируют белки, которые участвуют в репарации большинства генетических дефектов, возникающих из-за нарушений репликации ДНК, действия ионизирующей радиации или канцерогенов из окружающей среды. Мутации данных генов приводят к повышенной частоте нерепарируемых повреждений (мутаций) других генов, включая протоонкогены и гены опухолевых супрессоров, что в свою очередь приводит к развитию рака. К «генам-смотрителям» относятся ген *ATM* (см. рис. 12-48), семейство генов *XP*, мутации которых приводят к развитию пигментной ксеродермы, а также гены *BRCA1*,

связанные с некоторыми типами рака молочной железы (см. доп. 25-1). Мутации в гене белка p53 также вызывают опухоли. Более чем в 90% случаев плоскоклеточного рака кожи и в 50% всех остальных видов рака у человека ген *p53* дефектный. Те редкие люди, которые наследуют одну дефектную копию *p53*, обычно страдают раковым синдромом Ли–Фраумени, при котором с высокой частотой и в раннем возрасте возникают множественные злокачественные опухоли (молочной железы, мозга, костей, крови, легких и кожи). Объяснение возникновения множественных опухолей в этих случаях то же самое, что и при мутациях гена *Rb*: у человека, рожденного с одной дефектной копией *p53* в каждой соматической клетке в течение жизни вероятно появление вторичной мутации *p53* более чем в одной клетке.

Таким образом, развитие рака может быть связано с тремя группами причин: дефекты онкогенов можно сравнить с постоянно нажатой педалью акселератора автомобиля при работающем моторе, мутации генов опухолевых супрессоров можно сравнить с неработающими тормозами, а мутации «генов-смотрителей», приводящие к отсутствию репарации механизма репликации, сравнимы с неквалифицированным механиком, обслуживающим ваш автомобиль.

Мутации в онкогенах и генах опухолевых супрессоров не обладают эффектом «все или ничего». При некоторых опухолях, а, возможно, при всех, переход от нормальной клетки до злокачественной опухоли требует накопления мутаций (иногда в течение нескольких десятилетий), ни одна из мутаций в отдельности не несет ответственности за конечный эффект. Например, развитие рака прямой кишки имеет несколько распознаваемых стадий, и каждая из них связана с мутацией (рис. 12-50). Если нормальная эпителиальная клетка кишечника претерпевает мутации в обеих копиях гена опухолевого супрессора *APC* (от англ. *adenomatous polyposis coli* — аденоматозный полипоз толстой кишки), она начинает делиться быстрее, чем нормальная и производит собственный клон — доброкачественный полип (ранняя аденома). По неизвестным пока причинам мутация *APC* приводит к хромосомной нестабильности; целые области хромосомы утрачиваются или перестраиваются в процессе деления клетки. Эта нестабильность может приводить ко второй мутации, обычно в гене

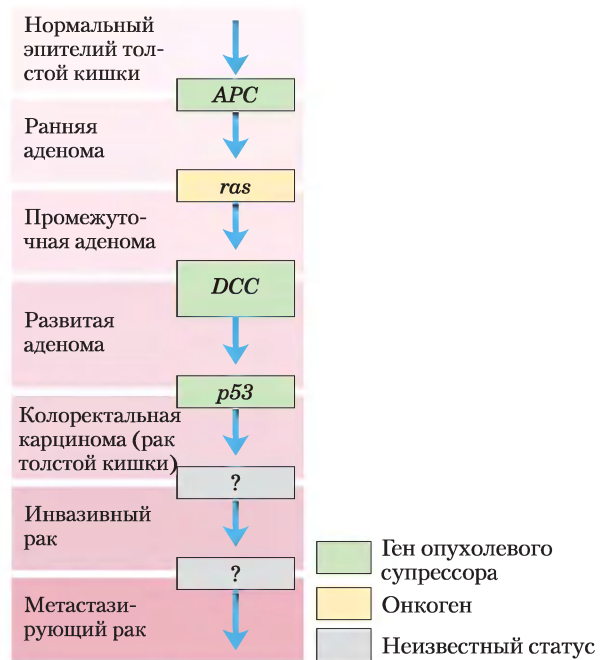


Рис. 12-50. От нормальной эпителиальной клетки к раку кишечника. В толстой кишке мутации в обеих копиях гена опухолевого супрессора *APC* приводят к доброкачественным новообразованиям — скоплениям эпителиальных клеток, которые слишком быстро размножаются (ранняя аденома). Если клетка, уже имеющая дефект в *APC*, подвергается второй мутации в протоонкогене *ras*, дважды мутантная клетка дает начало промежуточной аденоме, образуя доброкачественный кишечный полип. Когда одна из таких клеток подвергается дальнейшим мутациям в генах опухолевых супрессоров *DCC* (окончательно не установлено) и *p53*, образуются опухоли, агрессивность которых все более нарастает. Затем мутации в еще не охарактеризованных генах приводят к злокачественной опухоли и в конечном итоге к метастазирующему раку, который может распространяться в другие ткани. По-видимому, большинство злокачественных опухолей возникают в результате серии мутаций такого рода.

ras, которая превращает клон в промежуточную аденому. Третья мутация (вероятно, в гене опухолевого супрессора *DCC*) приводит к поздней аденоме. Только когда обе копии *p53* станут дефектными, клеточная масса действительно станет карциномой — злокачественной опухолью, опасной для жизни. Весь процесс в целом требует, таким образом, наличия по крайней мере семи генетических нарушений: двух в каждом из трех генов опухолевых супрессоров (*APC*, *DCC* и *p53*) и одного в протоонкогене *ras*. Наверное, су-

ществуют еще несколько других путей развития колоректального рака, но механизм, по которому злокачественный процесс является результатом множественных мутаций, вероятно, всегда выдерживается. Если полип обнаруживают на стадии ранней аденомы и хирургическим путем удаляют клетки, несущие первые мутации, поздние аденомы и карциномы не разовьются; отсюда очевидно значение ранней диагностики. У клеток и многоклеточных организмов есть система ранней детекции дефектов. Например, белки ATM и ATR, описанные в разд. 12.11, обнаруживают протяженные повреждения ДНК, которые не могут быть эффективно восстановлены. Далее они запускают процесс апоптоза (с участием p53); в результате опасные для организма клетки уничтожают сами себя. ■

Апоптоз — программируемая гибель клетки

Многие клетки могут точно контролировать время своей собственной смерти с помощью процесса **программируемой клеточной гибели** или **апоптоза** (от греч. *apoptosis* — опадание листьев). Например, при развитии зародыша некоторые клетки должны отмереть. Формирование пальцев из коротких зачатков конечностей требует хронометрированной гибели клеток между развивающимися костями пальцев. В процессе развития нематоды *Caenorhabditis elegans* из оплодотворенного яйца точно 131 клетка (из общего числа 1090 соматических клеток в эмбрионе) должна подвергнуться запрограммированной смерти для того, чтобы образовался взрослый организм.

Апоптоз имеет значение и в других процессах, а не только при развитии. Когда производящая антитело клетка начинает образование антител против антигена, присутствующего в организме в норме, эта клетка подвергается запрограммированной гибели в тимусе (вилочковой железе). Апоптоз необходим организму для элиминации аутоантител. Ежемесячное отторжение клеток стенки матки (менструация) представляет собой другой случай гибели нормальных клеток, происходящей путем апоптоза. Иногда самоубийство клетки не запрограммировано, а происходит в ответ на биологические обстоятельства, которые предвещают гибель организма. Например, инфицированная виру-

сом клетка, умирающая до окончания цикла инфицирования, предотвращает распространение вируса на соседние клетки. Разные стрессовые воздействия, такие как высокая температура, гипертосмоляльность, УФ- и гамма-излучения, также приводят в действие механизм клеточного самоубийства — целому организму лучше, если поврежденные клетки погибают.

Регуляторные механизмы, запускающие апоптоз, основаны на действии некоторых пептидов, которые регулируют клеточный цикл. Сигнал к самоубийству часто приходит извне, через поверхностный рецептор. Фактор некроза опухолей (ФНО; TNF, от англ. *tumor necrosis factor*), продуцируемый клетками иммунной системы, взаимодействует с клетками посредством специфических TNF-рецепторов. Эти рецепторы имеют TNF-связывающие центры на внешней поверхности плазматической мембраны и «домен смерти», содержащий около 80 аминокислотных остатков, который передает сигнал к самоликвидации через мембрану на цитозольные белки, такие как TRADD (от англ. *TNF receptor-associated death domain*; **рис. 12-51**). Другой рецептор, Fas, имеет похожий домен смерти, позволяющий ему взаимодействовать с цитозольным белком FADD (от англ. *Fas-associated death domain*), который активирует цитозольную протеазу, называемую каспазой 8. Этот белок принадлежит к семейству протеаз, участвующих в апоптозе; все они синтезируются в виде неактивных проферментов, все содержат ключевой остаток Cys в активном центре и все гидролизуют белки-мишени по С-концу специфического остатка Asp (отсюда и название «каспазы», от Cys и Asp).

Каспаза 8, каспаза-«инициатор», активируемая апоптотическим сигналом, передаваемым через FADD, затем самоактивируется, расщепляя собственный профермент. Мишенями активной каспазы 8 могут быть митохондрии. Протеаза приводит к высвобождению некоторых белков, содержащихся между наружной и внутренней митохондриальными мембранами: цитохрома *c* (гл. 19) и нескольких эффекторных каспаз. Цитохром *c* связывается с проферментной формой эффекторной каспазы 9 и стимулирует ее протеолитическую активацию. Активированная каспаза 9 в свою очередь катализирует деструкцию клеточных белков, а это и есть глав-

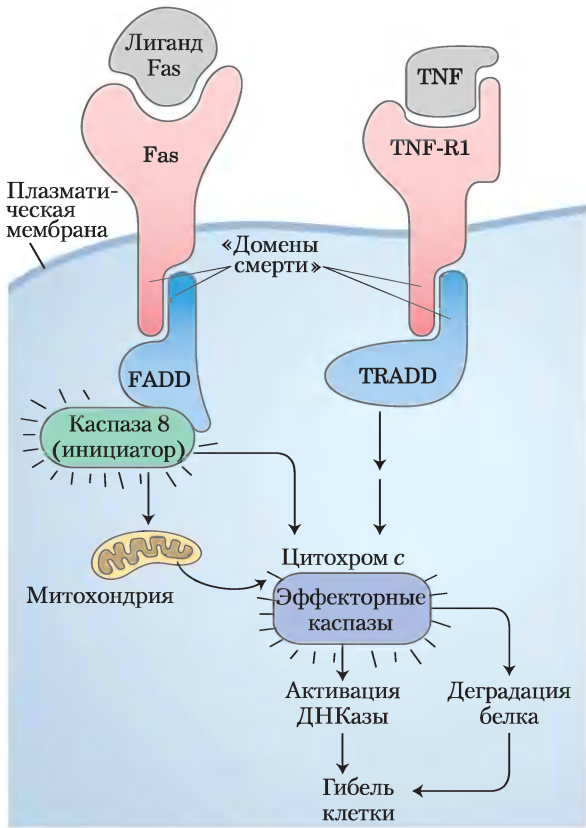


Рис. 12-51. Основные события апоптоза. Рецепторы плазматической мембраны (Fas, TNF-R1) получают сигналы извне (от лиганда Fas или фактора некроза опухолей TNF соответственно). Активированный рецептор обеспечивает взаимодействие между «доменом смерти» (последовательность из 80 аминокислот) в Fas или TNF-R1 и похожим доменом смерти в цитозольных белках FADD или TRADD. FADD активирует цитозольную протеазу каспазу 8, которая протеолитически активирует другие клеточные протеазы. TRADD также активирует протеазы. Итоговый протеолиз является главным фактором гибели клетки.

ная причина гибели клеток в результате апоптоза. Одной из специфических мишеней действия каспазы является активируемая каспазой дезоксирибонуклеаза.

При апоптозе мономерные продукты деградации белка и ДНК (аминокислоты и нуклеотиды) высвобождаются в результате контролируемого процесса, который делает возможным их улавливание и использование соседними клетками. Таким образом, апоптоз позволяет организму удалить клетку без потери ее компонентов.

Краткое содержание раздела 12.12 ОНКОГЕНЫ, ГЕНЫ ОПУХОЛЕВЫХ СУПРЕССОРОВ И ПРОГРАММИРУЕМАЯ ГИБЕЛЬ КЛЕТКИ

- Онкогены кодируют дефектные сигнальные белки. Непрерывно подавая сигнал к делению клеток, они приводят к образованию опухоли. Онкогены являются генетически доминантными и могут кодировать дефектные факторы роста, рецепторы, G-белки, протеинкиназы или ядерные регуляторы транскрипции.
- Гены опухолевых супрессоров кодируют регуляторные белки, которые в норме тормозят клеточное деление; мутации в этих генах генетически рецессивны, но могут приводить к образованию опухоли.
- Рак возникает обычно как результат накопления мутаций в онкогенах и генах опухолевых супрессоров.
- При мутации «генов-смотрителей», кодирующих белки, необходимые для репарации генетических повреждений, остаются без репарации повреждения в других генах, включая мутации протоонкогенов и генов опухолевых супрессоров, что может привести к развитию рака.
- Апоптоз может запускаться внеклеточными сигнальными веществами, такими как TNF, через рецепторы плазматической мембраны.

Ключевые термины

Термины, выделенные жирным шрифтом, объясняются в глоссарии.

β -адренергический рецептор 597	Ca^{2+} /кальмодулинзависимые протеинкиназы (CaM киназы I–IV) 614
β -аррестин (arr; аррестин 2) 606	cAMP-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа A; PKA) 599
3',5'-циклический гуанозинмонофосфат (циклический GMP, cGMP) 627	cGMP-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа G; PKG) 627
АКАР (белки, связывающиеся с киназой A) 608	

CREB 608
G-белок 596
 MAPK 622
 MAPK-каскад 622
SH2-домен 619
Аутофосфорилирование
 619
Агонисты 597
Адаптерные белки 608
 Аденилатциклаза 599
 Амплификация 592
 Анализ по Скэтчарду 593
Антагонисты 597
Апоптоз 672
 Аррестин 1 654
 Белки-активаторы
 ГТРАЗы 601
 Белок ретинобластомы
 (pRb) 665
Вторичный мессенджер
 596
**Гены опухолевых супрес-
 соров** 670
 Гуанозиннуклеотидсвязывающий белок 596
**Двухкомпонентные сиг-
 нальные системы** 645
Десенсибилизация 594
**Зеленый флуоресцентный
 белок (GFP)** 612
**Ингибиторный G-белок
 (G_i)** 608
 Инозит-1,4,5-трисфосфат
 (IP₃) 611
 Интегрин 641
 Кальмодулин (CaM) 614
 Киназа β-адренергического
 рецептора (βARK) 597
**Консенсусная последова-
 тельность** 603
Кооперативность 592
Малые G-белки 619
 Никотиновый ацетилхоли-
 новый рецептор 638
Онкогены 666
 Опсин 652
 Программируемая гибель
 клетки 672
Протеасома 663
 Протеинкиназа C (PKC)
 611
Протоонкогены 666
 Регулятор ответа 645
 Регуляторы сигнализации
 G-белков (RGS) 658
 Резонансный перенос
 энергии флуоресцен-
 ции (FRET) 613
**Рецепторная тирозинки-
 наза (RTK)** 619
 Рецепторная гистидин-
 киназа 645
Рецепторный потенциал
 656
 Рецептороподобная киназа
 (RLK) 648
**Рецепторы, сопряженные
 с G-белком (GPCR)**
 596
Родопсин 652
 Родопсинкиназа 654
**Сопряженные с G-белком
 рецепторные киназы
 (GRK)** 606
**Стимулирующий G-белок
 (G_s)** 598
Трансдукция сигнала 591
 Трансдукцин 652
Убиквитин 662
Факторы роста 664
 Факторы обмена гуаниди-
 новых нуклеотидов
 (GEF) 601
Ферментативный каскад
 592
 Фосфодиэстераза цикли-
 ческих нуклеотидов
 606
 Фосфолипаза C 609
Циклин 661
 Циклинзависимая
 протеинкиназа
 (CDK) 661
Цитокин 624
**Элемент гормонального
 ответа (HRE)** 643

Исторический обзор достижений в области фосфори-
 лирования белков.

Giepmans, B.N.G., Adams, S.R., Ellisman, M.H., & Tsien, R.Y. (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function *Science* **312**, 217–224.

Краткий обзор среднего уровня сложности о FRET.

Pawson, T. & Scott, J.D. (2005) Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 286–290.

Рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR)

Beene, D.L. & Scott, J.D. (2007) A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 192–198.

Birnbaumer, L. (2007) The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 756–771.

Cooper, D.M.F. & Crossthwaite, A.J. (2006) Higher-order organization and regulation of adenylyl cyclases. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 426–431.

DeWire, S.M., Ahn, S., Lefkowitz, R.J., & Shenoy, S.K. (2007) β-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 483–510.

Обзор повышенного уровня сложности; один из пяти обзоров об аррестинах в этом номере.

Escribá, P.V. (2007) G protein-coupled receptors, signaling mechanisms and pathophysiological relevance. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1768**, 747.

Предисловие редактора к циклу из 20 статей о GPCR.

Fredriksson, R. & Schiöth, H.B. (2005) The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* **67**, 1414–1425.

Hamm, H.E. (1998) The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**, 669–672.

Введение к циклу коротких обзоров о G-белках.

Kim, C., Xuong, N.-H., & Taylor, S.S. (2005) Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIα) subunits of PKA. *Science* **307**, 690–696.

Kobilka, B.K. (2006) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1769**, 794–807.

Lefkowitz, R.J. (2007) Introduction to special section on arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* **69**.

Предисловие к пяти отличным обзорам повышенного уровня сложности, посвященным функциям аррестина.

Pinna, L.A. & Ruzzene, M. (1996) How do protein kinases recognize their substrates? *Biochim. Biophys. Acta* **1314**, 191–225.

Углубленный обзор, посвященный факторам (в том числе консенсусным последовательностям), которые придают протеинкиназам их специфичность.

Дополнительная литература для дальнейшего изучения

Общие вопросы

Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 596–601.

Rehmann, H., Wittinghofer, A., & Bos, J.L. (2007) Capturing cyclic nucleotides in action: snapshots from crystallographic studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 63–73.

Schoeneberg, T., Hofreiter, M., Schulz, A., & Roempler, H. (2007) Learning from the past: evolution of GPCR functions. *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 117–121.

Yeagle, P.L. & Albert, A.D. (2006) G-protein coupled receptor structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 808–824.

Zhang, J., Campbell, R.E., Ting, A.Y., & Tsien, R.Y. (2002) Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Molec. Cell Biol* **3**, 906–918.

Основы методов, описанных в доп. 12-2.

Рецепторные ферменты

Garbers, D.L., Chrisman, T.D., Wiegand, P., Katafuchi, T., Albanesi, J.P., Bielinski, V., Barylko, B., Redfield, M.M., & Burnett, J.C., Jr. (2006) Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 251–258.

Hubbard, S.R. & Miller, W.T. (2007) Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 117–123.

Maures, T.J., Kurzer, J.H., & Carter-Su, C. (2007) SH2B1 (SH2-B) and JAK2: a multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 38–45.

Saltiel, A.R. & Pessin, J.E. (2002) Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 65–71.

Краткий обзор среднего уровня сложности.

Schaeffer, H.J. & Weber, M.J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2435–2444.

Обзор среднего уровня сложности, посвященный MAP-киназам и основам специфической сигнализации, осуществляемой с помощью этих сигнальных белков.

Tiganis, T. & Bennett, A.M. (2007) Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochem. J.* **402**, 1–15.

Zajchowski, L.D. & Robbins, S.M. (2002) Lipid rafts and little caves: compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur. J. Biochem.* **269**, 737–752.

Адаптерные белки и мембранные рафты

Bhattacharyya, R.P., Reményi, A., Yeh, B.J., & Lim, W.A. (2006) Domains, motifs, and scaffolds: the role of modular interactions in the evolution and wiring of cell signaling circuits. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 655–680.

Обзор повышенного уровня сложности о модульных сигнальных белках.

Pawson, T. & Nash, P. (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **300**, 445–452.

Обзор среднего уровня сложности, посвященный мультивалентным белкам и комплексам, которые они образуют.

Smith, F.D., Langeberg, L.K., & Scott, J.D. (2006) Anchored cAMP signaling: onward and upward. A short history of compartmentalized cAMP signal transduction. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 581–698.

Краткий среднего уровня сложности обзор, предваряющий журнальную статью, посвященную сигнализации с помощью AKAP и cAMP.

Smith, F.D., Langeberg, L.K., & Scott, J.D. (2006) The where's and when's of kinase anchoring. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 316–323.

Среднего уровня сложности обзор об AKAP.

Рецепторные ионные каналы

См. также: дополнительную литературу к гл. 11, ионные каналы

Ashcroft, F.M. (2006) From molecule to malady. *Nature* **440**, 440–447.

Краткий обзор среднего уровня сложности о заболеваниях человека, связанных с дефектами ионных каналов.

Changeux, J.-P. & Edelstein, S.J. (2005) Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* **308**, 1424–1428.

Краткое среднего уровня сложности описание аллостерической регуляции рецепторов на примере ацетилхолинового рецептора.

Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y. (2006) How does voltage open an ion channel? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 23–52.

Ионы кальция в механизмах сигнализации

Berridge, M.J., Lipp, P., & Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat. Rev. Molec. Cell Biol.* **1**, 11–21.

Обзор среднего уровня сложности.

Chin, D. & Means, A.R. (2000) Calmodulin: a prototypical calcium receptor. *Trends Cell Biol.* **10**, 322–328.

Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J.D., & Herman, B. (1999) Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* **79**, 1089–1125.

Углубленного уровня обзор методов оценки внутриклеточной концентрации Ca²⁺ в реальном времени.

Интегрины

Delon, I. & Brown, N.H. (2007) Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 43–50.

Рецепторы стероидных гормонов и их действие

Biggins, J.B. & Koh, J.T. (2007) Chemical biology of steroid and nuclear hormone receptors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 99–110.

Hall, J.M., Couse, J.F., & Korach, K.S. (2001) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 36 869–36 872.

Краткий обзор среднего уровня сложности.

Сигнализация у растений и бактерий

Assmann, S.M. (2005) G proteins go green: a plant G protein signaling FAQ sheet. *Science* **310**, 71–73.

Bakal, C.J. & Davies, J.E. (2000) No longer an exclusive club: eukaryotic signaling domains in bacteria. *Trends Cell Biol.* **10**, 32–38.

Обзор среднего уровня сложности.

Becraft, P.W. (2002) Receptor kinase signaling in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 163–192.

Углубленный обзор.

Chen, Y.F., Etheridge, N., & Schaller, G.E. (2005) Ethylene signal transduction. *Ann. Botany* **95**, 901–915.

Обзор среднего уровня сложности.

Ferreira, F.J. & Kieber, J.J. (2005) Cytokinin signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 518–525.

Hwang, I., Chen, H.-C., & Sheen, J. (2002) Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383–389.

Li, J. & Jin, H. (2007) Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends Plant. Sci.* **12**, 37–41.

Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, Y., Li, W., Wu, W.-H., & Ma, L. (2007) A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* **315**, 1712–1216.

McCarty, D.R. & Chory, J. (2000) Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* **103**, 201–209.

Meijer, H.J.G. & Munnik, T. (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**, 265–306.

Углубленный обзор.

Nakagami, H., Pitzschke, A., & Hirt, H. (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Sci.* **10**, 339–346.

Paciorek, T. & Friml, J. (2006) Auxin signaling. *J. Cell Sci.* **119**, 1199–1202.

Tichtinsky, G., Vanoosthuysse, V., Cock, J.M., & Gaude, T. (2003) Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends Plant Sci.* **8**, 231–237.

Vert, G., Nemhauser, J.L., Geldner, N., Hong, F., & Chory, J. (2005) Molecular mechanisms of steroid hormone signalling in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 177–201.

Зрение, обоняние и вкус

Baylor, D. (1996) How photons start vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 560–565.

Один из шести кратких обзоров, посвященных зрению.

Margolskee, R.F. (2002) Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J. Biol. Chem.* **277**, 1–4.

Menon, S.T., Han, M., & Sakmar, T.P. (2001) Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiol. Rev.* **81**, 1659–1688.

Углубленный обзор.

Mombaerts, P. (2001) The human repertoire of odorant receptor genes and pseudogenes. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2**, 493–510.

Углубленный обзор.

Клеточный цикл и рак

Bartek, J. & Lukas, J. (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 238–245.

Bublil, E.M. & Yarden, Y. (2007) The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 124–134.

Chau, B.N. & Wang, J.Y.J. (2003) Coordinated regulation of life and death by RB. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 130–138.

Dorsam, R.T. & Gutkind, J.S. (2007) G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Rev. Cancer* **7**, 79–94.

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159–170.

Приведены доказательства многостадийности процесса развития рака.

Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323–331.

Доступно описаны функции белка p53 в клеточном цикле в норме и при раке.

Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**, 261–291.

Углубленный обзор.

Obaya, A.J. & Sedivy, J.M. (2002) Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 126–142.

Sherr, C.J. & McCormick, F. (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 102–112.

Апоптоз

Anderson, P. (1997) Kinase cascades regulating entry into apoptosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 33–46.

Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305–1308.

Эта статья Грина и Рида, а также статьи Торнберри и Лазебника (см. ниже) опубликованы в номере журнала *Science*, посвященном апоптозу.

Duke, R.C., Ojcius, D.M., & Young, J.D.-E. (1996) Cell suicide in health and disease. *Sci. Am.* **275** (December), 80–87.

Green, D.R. & Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**, 1309–1312.

Jacobson, M.D., Weil, M., & Raff, M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347–354.

Lawen, A. (2003) Apoptosis—an introduction. *Bioessays* **25**, 888–896.

Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312.

Вопросы и задачи

1. Эксперименты с гормоном в бесклеточных системах. В 1950-х гг. Эрл Уилбур Сазерленд мл. и его коллеги провели пионерские эксперименты для выяснения механизма действия адреналина и глюкагона. Используя материал данной главы, интерпретируйте каждый из описанных ниже опытов. Идентифицируйте вещество X и продемонстрируйте значимость результатов.

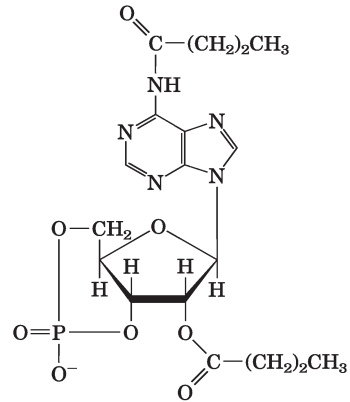
а) Добавление адреналина в гомогенат нормальной печени приводило к увеличению активности гликогенфосфорилазы. Однако если гомогенат предварительно подвергали центрифугированию с высокой скоростью, а адреналин или глюкагон добавляли в прозрачную надосадочную фракцию, содержащую фосфорилазу, никакого увеличения активности не происходило.

б) Когда полученную в результате центрифугирования фракцию, содержащую частицы, обрабатывали адреналином, происходило образование вещества X. Это вещество было выделено и очищено. В отличие от адреналина вещество X активировало гликогенфосфорилазу при добавлении к прозрачному супернатанту, полученному при центрифугировании гомогената.

в) Вещество X было устойчиво к нагреванию, т. е. тепловая обработка не влияла на его способность активировать фосфорилазу. (*Подсказка.* Могло ли это происходить, если бы вещество X представляло собой белок?) Вещество X было почти идентично соединению, получаемому при обработке чистого АТР гидроксидом бария (см. рис. 8-6).

2. Сравнение влияния дибутирил-сАМР и сАМР на интактные клетки. Физиологическое действие адреналина в принципе можно имитировать добавлением сАМР к клеткам-мишеням. На практике добавление сАМР к интактным клеткам-мишеням вызывает самый минимальный физиологический ответ. Почему? Когда структурно родственное производное дибутирил-

сАМР (см. ниже) добавляют к интактным клеткам, ожидаемый физиологический ответ совершенно очевиден. Объясните, в чем точные ответы на эти два вещества различны. Дибутирил-сАМР широко применяется в исследованиях функций сАМР.



Дибутирил сАМР
(циклический N⁶, O^{2'}-дибутириладенозинмонофосфат)

3. Действие холерного токсина на аденилатциклазу. Грамотрицательная бактерия *Vibrio cholerae* вырабатывает белок — холерный токсин ($M_r = 90\,000$), обуславливающий характерный симптом холеры: огромную потерю организмом воды и Na⁺ вследствие непрерывной изнурительной диареи. Если объем жидкости и содержание Na⁺ в организме не пополняются, происходит сильное обезвоживание, и в отсутствие лечения болезнь всегда кончается смертью. Когда холерный токсин получает доступ в кишечный тракт, он прочно связывается со специфическими центрами на плазматической мембране эпителиальных клеток выстилки тонкого кишечника, вызывая длительную активацию аденилатциклазы (в течение часов или дней).

а) Как влияет холерный токсин на концентрацию сАМР в клетках кишечника?

б) Основываясь на приведенной выше информации, предположите, как в норме функционирует сАМР в клетках кишечного эпителия.

в) Предложите возможный способ лечения холеры.

4. Мутации в РКА. Объясните, как мутации в R- или C-субъединице сАМР-зависимой протеинкиназы (РКА) могут приводить (а) к постоянно активной РКА или (б) к постоянно ингибированной РКА.

5. Терапевтические эффекты альбутерола.

Нарушение дыхания при астме возникает из-за спазма бронхов и бронхиол легких вследствие сокращения гладкой мускулатуры их стенок. Этот спазм может быть снят путем увеличения концентрации сАМР в гладких мышцах. Объясните терапевтические эффекты альбутерола, β -адренергического агониста, принимаемого (путем ингаляции) при астме. Как вы думаете, вызывает ли это лекарство какие-либо побочные действия? Как создать лекарство, не имеющее этих побочных эффектов?

6. Прерывание гормональных сигналов. Сигналы, передаваемые гормонами, в конце концов должны быть прерваны. Опишите несколько разных механизмов торможения сигнала.

7. Использование FRET для изучения белковых взаимодействий *in vivo*. На рис. 12-8 изображено взаимодействие между β -аррестином и β -адренергическим рецептором. Как с помощью метода FRET (см. доп. 12-3) продемонстрировать наличие этого взаимодействия в живых клетках? Слияние каких белков следует произвести? Светом с какой длиной волны нужно облучать клетки, а при какой длине волны следить за происходящими изменениями? Какие изменения можно наблюдать, если исследуемое взаимодействие происходит? А если взаимодействия нет? Как объяснить невозможность демонстрации этого взаимодействия с помощью данного метода?

8. Введение ЭДТА. ЭДТА (этиленгликоль-N,N'- β -аминоэтиловый эфир) N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты) является хелатирующим агентом с высоким сродством и специфичностью по отношению к Ca^{2+} . Делая микроинъекции соответствующего раствора Ca^{2+} -ЭДТА в клетку, экспериментатор может предотвратить рост концентрации Ca^{2+} в цитозоле выше 10^{-7} М. Как изменила бы микроинъекция ЭДТА клеточный ответ на вазопрессин (см. табл. 12-5)? На глюкагон?

9. Усиление гормональных сигналов. Опишите все источники усиления в системе инсулинового рецептора.

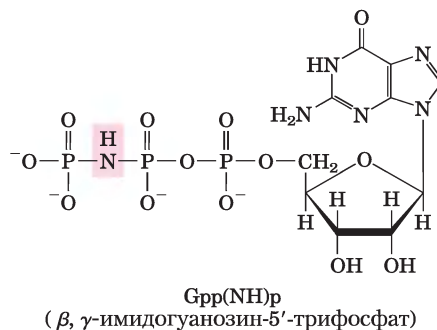
10. Мутации *ras*. Как мутация гена *ras*, приводящая к образованию белка Ras, не обладающего

ГТРазной активностью, изменяет клеточный ответ на инсулин?

11. Различия в G-белках. Сравните G-белки G_s (работают при передаче сигнала от β -адренергических рецепторов) и Ras. Какие свойства являются для них общими? Чем они отличаются? В чем функциональное различие между G_s и G_i ?

12. Механизмы регуляции протеинкиназ. Укажите восемь главных типов протеинкиназ, обнаруженных в клетках эукариот, и объясните, какой фактор непосредственно отвечает за активацию каждой протеинкиназы.

13. Негидролизуемые аналоги GTP. Многие ферменты могут гидролизовать GTP по связи между β - и γ -фосфатами. Аналог GTP β,γ -имидогуанозин-5'-трифосфат Gpp(NH)p, изображенный ниже, не гидролизуется по этой связи (между β - и γ -фосфатами). Предскажите эффект микроинъекции Gpp(NH)p в миоциты на клеточный ответ при β -адренергической стимуляции.



14. Использование токсина для очистки белка ионного канала. α -Бунгаротоксин — мощный нейротоксин из яда змеи *Bungarus multicinctus*. Он с высокой специфичностью связывается с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами и мешает открыванию ионных каналов. Это взаимодействие использовали для выделения и очистки ацетилхолинового рецепторного белка из электрического органа ската.

а) Объясните стратегию выделения ацетилхолинового рецептора с помощью α -бунгаротоксина, ковалентно связанного с хроматографическими гранулами. (Подсказка. См. рис. 3-17, в.)

б) Объясните стратегию очистки ацетилхолинового рецептора с помощью [125 I] α -бунгаротоксина.

15. Мембранный потенциал покоя. Многие необычные беспозвоночные, в том числе гигантские моллюски, мидии и полихеты, живут на дне океана на границах гидротермальных источников, где температура составляет 60 °С.

а) Мембранный потенциал покоя мускула-замыкателя глубоководного гигантского моллюска –95 мВ. Могли бы вы предсказать этот мембранный потенциал по данным следующей таблицы? Почему да или почему нет?

Ион	Концентрация, мМ	
	Внутриклеточная	Внеклеточная
Na ⁺	50	440
K ⁺	400	20
Cl ⁻	21	560
Ca ²⁺	0,4	10

б) Считайте, что мембрана мускула-замыкателя проницаема только для ионов, перечисленных выше. Какой ион определяет мембранный потенциал V_m ?

16. Мембранные потенциалы в икринках лягушки. Оплодотворение яйцеклетки лягушки сперматозоидом приводит в действие ионные каналы, по распространению потенциала действия похожие на каналы нейронов, и инициирует события, приводящие к делению клетки и развитию эмбриона. Ооциты можно стимулировать к делению без оплодотворения, суспендируя их в 80 мМ KCl (обычная прудовая вода содержит 9 мМ KCl).

а) Рассчитайте, как изменение внеклеточной концентрации KCl изменит мембранный потенциал покоя ооцита. (*Подсказка.* Считайте, что ооцит содержит 120 мМ K⁺ и проницаем *только* для K⁺.) Температура 20 °С.

б) Когда эксперимент повторяют в воде, не содержащей Ca²⁺, увеличение концентрации KCl не оказывает эффекта. На какие мысли это наводит относительно механизма действия KCl?

17. Возбуждение, вызываемое гиперполяризацией. В большинстве нейронов *деполяризация* мембраны приводит к открытию потенциалазависимых ионных каналов, генерации потенциала действия и в конце концов к входу Ca²⁺, вызывающему высвобождение нейромедиатора в

окончании аксона. Разработайте клеточную стратегию, при которой *гиперполяризация* в палочках сетчатки вызывала бы возбуждение зрительного сигнального пути и прохождение зрительного сигнала в головной мозг. (*Подсказка.* Передача нервных импульсов у высших организмов проходит через *серию* нейронов, которые переносят информацию в мозг (см. рис. 12-35). Сигнальный фактор, высвобождаемый одним нейроном, может быть либо возбуждающим, либо тормозным относительно следующего, постсинаптического нейрона.)



18. Генетические «каналопатии». Многие генетические заболевания связаны с дефектами ионных каналов. Для каждого из описанных ниже случаев объясните, какое молекулярное нарушение могло привести к данным симптомам.

а) Мутация с потерей функции гена, кодирующего α -субъединицу cGMP-зависимого катионного канала колбочек сетчатки, приводит к полной неспособности различать цвета.

б) Нефункциональные аллели гена, кодирующего α -субъединицу АТР-зависимого калиевого канала (см. рис. 23-29), приводят к состоянию, называемому врожденным гиперинсулинизмом, при котором в крови постоянно повышен уровень инсулина.

в) Мутация β -субъединицы АТР-зависимого калиевого канала, нарушающая связывание АТР, приводит к неонатальному диабету — пониженному уровню инсулина в крови у новорожденных детей.



19. Зрительная десенсибилизация. Болезнь Огучи представляет собой наследуемую форму ночной слепоты. Подверженные ей люди медленно восстанавливают зрение после вспышки яркого света на фоне темноты (например, света автомобильных фар на шоссе). Сделайте предположение, какие молекулярные дефекты (или дефект) могут иметь место при болезни Огучи. Поясните на молекулярном уровне, как этот дефект объясняет ночную слепоту.

20. Влияние аналога cGMP на палочки сетчатки. Аналог cGMP, 8-Br-cGMP, способный проникать через клеточную мембрану, очень медленно разрушается под действием фосфодиэстеразной активности в палочках сетчатки, но вызывает


открытие управляемого канала во внешнем сегменте клетки так же эффективно, как cGMP. Что можно наблюдать, если подействовать светом на суспензию палочек в буфере со сравнительно высокой концентрацией 8-Br-cGMP, измеряя при этом мембранный потенциал клеток?

21. Ощущение горячего и холодного при приеме пищи. Ощущения горячего и холодного передаются группой регулируемых температурой катионных каналов. Например, каналы TRPV1, TRPV3 и TRPM8 обычно закрыты, но открываются при следующих условиях: TRPV1 при $t \geq 43^\circ\text{C}$, TRPV3 при $t \geq 33^\circ\text{C}$, а TRPM8 при $t < 25^\circ\text{C}$. Эти каналы экспрессируются в чувствительных нейронах, которые отвечают за ощущения тепла.

а) Предложите модель, объясняющую, каким образом действие высокой температуры на чувствительный нейрон, содержащий TRPV1, приводит к ощущению тепла.

б) Капсаицин, один из активных компонентов жгучего перца, — агонист TRPV1. В концентрации 32 нМ это вещество на 50% активирует ответ TRPV1 (т. е. EC_{50} капсаицина составляет 32 нМ). Объясните, почему всего несколько капель соуса, в состав которого входит жгучий перец, вызывают ощущение горячего, на самом деле не обжигая рот.

в) Ментол, входящий в состав мяты, является агонистом TRPM8 ($EC_{50} = 30$ мкМ) и TRPV3 ($EC_{50} = 20$ мМ). Какое ощущение вы испытаете, взяв в рот небольшое количество ментола? А если взять много ментола?

 **22. Онкогены, гены опухолевых супрессоров и рак.** Объясните, почему в каждой из описанных ниже ситуаций может происходить неконтролируемое деление клеток.


а) При раке толстой кишки часто возникают мутации гена, кодирующего рецептор простагландина E_2 . Простагландин PGE_2 — это фактор роста, необходимый для деления клеток желудочно-кишечного тракта.

б) Саркома Капоши часто обнаруживается у больных СПИДом, не получающих лечения. Этот вид рака вызван вирусом, один из генов которого кодирует белок, напоминающий хемокиновые рецепторы CXCR1 и CXCR2. Хемокины — это специфические для определенного типа клеток ростовые факторы.

в) Аденовирус, приводящий к возникновению рака, несет ген белка E1A, который связывается с белком ретинобластомы pRb. (Подсказка. См. рис. 12-48.)

г) Многие онкогены и гены опухолевых супрессоров специфичны для определенного типа клеток. Например, мутации рецептора PGE_2 обычно не встречаются при раке легкого. Объясните это наблюдение. (Напомним, что PGE_2 действует посредством GPCR в плазматической мембране.)

23. Мутации в генах опухолевого супрессора и онкогенах. Объясните, почему мутации в генах опухолевого супрессора являются рецессивными (обе копии гена должны иметь дефекты, для того чтобы была нарушена регуляция клеточного деления), в то время как мутации в онкогенах доминантные.

 **24. Ретинобластома у детей.** Объясните, почему у некоторых детей с ретинобластомой развиваются множественные опухоли сетчатки в обоих глазах, в то время как другие имеют единичную опухоль только в одном глазу.

25. Специфичность сигнала для отдельных типов клеток. Обсудите правильность следующего предположения: «сигнальная молекула (гормон, фактор роста или нейромедиатор) вызывает идентичные ответы в различных типах клеток-мишеней, если эти мишени содержат одинаковые рецепторы».

Анализ экспериментальных данных

26. Вкусовые ощущения у мышей. На рис. 12-41 изображен путь передачи сигнала сладкого вкуса у млекопитающих. Приятный вкус обусловлен эволюционной адаптацией, способствующей потреблению животными питательных продуктов. Жао с соавторами (2003) изучали два главных приятных вкусовых ощущения — сладость и вкус умами*. Пикантный вкус ума-

* Вкус умами — вкус белковых веществ, характерный для блюд японской и вообще восточной кухни. На русский язык умами иногда переводят как «мясной вкус». — *Прим. пер.*

ми связан с наличием в продуктах определенных аминокислот, особенно аспарагиновой и глутаминовой кислот; возможно, именно этот вкус заставляет животных есть богатую белками пищу. Усилитель вкуса глутамат натрия усиливает это вкусовое ощущение. Было проведено исследование специфических вкусовых рецепторов (названных SR на рис. 12-41) для сладкого и умами. Было известно три таких рецепторных белка (T1R1, T1R2 и T1R3), которые функционируют как гетеродимерные комплексы: экспериментальным путем было установлено, что комплекс T1R1–T1R3 является рецептором умами, а комплекс T1R2–T1R3 — рецептором сладкого. Каким же образом вкусовое ощущение кодируется и посылается в мозг? Для этого процесса были предложены две модели. В клеточной модели предполагается, что отдельные сенсорные клетки экспрессируют только один тип рецептора; т. е. существуют «сладкие клетки», «горькие клетки», «клетки умами» и т. д., и клетки каждого типа посылают информацию в головной мозг посредством разных нервных клеток. Мозг «узнает» вкус на основании того, какое именно нервное волокно передает сигнал. В рецепторной модели предполагается, что отдельные сенсорные клетки имеют несколько типов рецепторов и передают различные сигналы в мозг по одному и тому же нервному волокну, однако сигнал зависит от того, какой рецептор активирован. В то время также было неизвестно, как связаны между собой различные вкусовые ощущения и нужны ли элементы системы восприятия одного вкуса для восприятия другого вкуса.

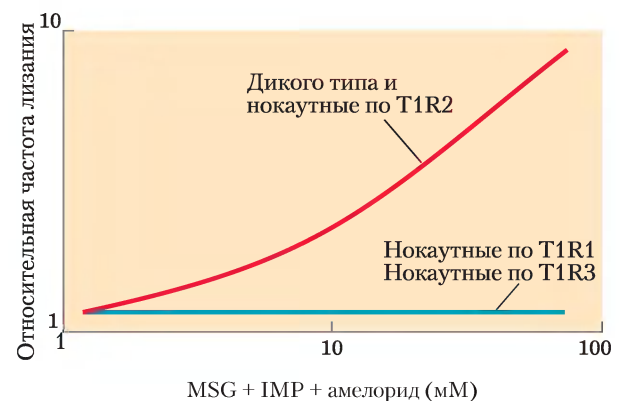
а) В одной из работ было показано, что различные рецепторные белки экспрессируются в неперекрывающихся наборах рецепторных клеток. Какую из двух описанных выше моделей подкрепляет это заключение? Объясните свой ответ.

Жао с коллегами получили мышей, обладающих гомозиготными аллелями, кодирующими один нефункциональный рецепторный белок (T1R1, T1R2 или T1R3), а также кодирующими одновременно два нефункциональных рецепторных белка — T1R2 и T1R3. Восприятие вкуса этими животными оценивали по тому, как часто они лизали растворы с тем или иным вкусом. Мыши облизывали горлышко бутылки с вкус-

ной жидкостью чаще, чем с невкусной. Измеряли «относительную частоту облизывания», т. е. определяли, насколько чаще животные облизывали горлышко данной бутылки по сравнению с горлышком бутылки с водой. Если значение этого параметра было равно единице, это означало, что животные не оказывали никакого предпочтения данной жидкости, значение параметра меньше единицы означало антипатию, значение больше единицы — предпочтение.

б) Все четыре линии мышей с «выключенными» генами продемонстрировали такое же отношение к соленым и горьким жидкостям, что и мыши дикого типа. Какую из описанных выше гипотез подтверждает это наблюдение? Какой вывод можно сделать на основании этих результатов?

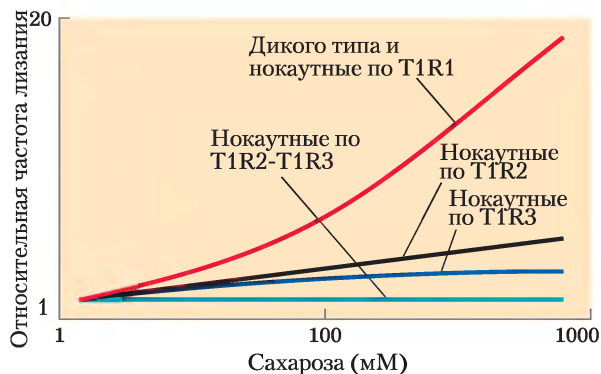
Далее исследователи изучали рецепторы вкуса умами, измеряя «относительную частоту облизывания» растворов с разным содержанием глутамата натрия мышами различных линий. В растворе, кроме того, содержался ионозинмонофосфат, усиливающий восприятие вкуса умами (обычный компонент японского супа рамэн, наряду с глутаматом натрия), а также амелорид, подавляющий приятный соленый вкус, связанный с присутствием ионов натрия (из глутамата натрия). Результаты эксперимента представлены в виде графика.



в) Согласуются ли эти данные с тем фактом, что рецепторы вкуса умами представляют собой гетеродимер, состоящий из белков T1R1 и T1R3, и почему?

г) Какую из моделей кодирования вкуса подтверждают эти данные? Объясните свои рассуждения.

Далее Жао с соавторами предприняли серию аналогичных экспериментов со сладким вкусом, используя для этого сахарозу. Результаты экспериментов представлены ниже.



д) Согласуются ли эти данные с тем фактом, что рецепторы сладкого вкуса представляют собой гетеродимер, состоящий из белков T1R2 и T1R3, и почему?

е) При очень высокой концентрации сахарозы были получены неожиданные результаты. Как это усложняет представленную выше модель гетеродимерного комплекса?

Наряду с сахарозой человек воспринимает сладкими и другие вещества (например, пептиды монеллин и аспартам), а мыши не воспринимают их сладкими. Жао с соавторами ввели в геном мыши с «выключенным» T1R2 копию человеческого гена T1R2 под контролем мышинового промотора T1R2. Такие мыши воспринимали монеллин и сахарин сладкими. В следующем эксперименте мышам с «выключенным» геном T1R1 вводили ген белка RASSL — G-белок-связанного рецептора для синтетического опиата спирадолина. Ген RASSL находился под контролем промотора, который индуцировался при введении в пищу мышей тетрациклина. Такие мыши не оказывали предпочтения спирадолину в отсутствие тетрациклина, но при добавлении тетрациклина в пищу животные явно предпочитали растворы спирадолина с наномолярной концентрацией.

ж) Как эти результаты подтверждают выводы Жао и его коллег относительно механизма передачи вкусовых ощущений?

Литература

Zhao, G.Q., Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N.J.P., & Zuker, C. (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* **115**, 255–266.

A

ABC-нуклеазы **3: 74, 78**
 ABC-транспортёры **1: 565; 2: 489**
 ACAT (ацил-СоА-холестеринацил-трансфераза) **2: 485, 492**
 ADAR **3: 176–178**
 AdoMet, см. Аденозинметионин
 ADP (аденозиндифосфат)
 – в синтезе жирных кислот **2: 451, 452**
 – в фотосинтезе **2: 357, 358**
 – перенос фосфатной группы **2: 73–76**
 – синтез **1: 45, 46**
 ADP-глюкоза **2: 426–428**
 ADP-глюкозопирофосфорилаза **2: 430**
 ADP-рибозилирование ферментов **1: 324, 602**
Aequorea victoria, флуоресцентные белки **1: 451, 612**
Agrobacterium tumefaciens, в клонировании **1: 469–471**
 AlkV белок, в репарации ДНК **3: 68, 75, 77**
 AMP (аденозинмонофосфат) **1: 44, 394; 2: 33, 546, 547, 550**
 – варианты формы **1: 427**
 – концентрация **1: 608, 614, 615**
 – модификация аллостерических ферментов **1: 329, 600, 604**
 АМРК (АМР-активируемая протеинкиназа) **2: 131, 243**
 – влияние адипонектина **2: 612**
 – стимуляция лептином **2: 609, 610**
 АМР-активируемая протеинкиназа, см. АМРК
 AP-эндонуклеазы **3: 68, 72, 73, 79**
 Araf-1 фактор апоптоза **2: 350**
 APC, мутации **1: 671**
 AroB-100 **2: 487–490**
 – редактирование РНК **3: 177**
 AroB-48, редактирование РНК **3: 177**
 АРОВЕС **3: 176, 177**
 ароЕ
 – в болезни Альцгеймера **2: 487**
 – связывание с рецепторами **2: 485, 487**
 Ар-сайт в репарации ДНК **3: 71**
Arabidopsis thaliana
 --- аквапорины **1: 572**
 --- сигнальные пути **1: 648, 649**
 --- синтез целлюлозы **2: 432**
Aspergillus niger, синтез лимонной кислоты **2: 204**
 АТФ (аденозинтрифосфат) **1: 45, 46, 424, 425**

– в активном транспорте **2: 40**
 – в биолюминесценции у светляков **2: 39**
 – в гликолизе **2: 75–80**
 – в глюконеогенезе **2: 103, 104**
 – в инициации репликации **3: 56, 57**
 – в протеолизе **3: 220, 221**
 – в регуляции гликолиза и глюконеогенеза **2: 143, 144**
 – в регуляции метаболизма **2: 129, 130**
 – в сердечной мышце **2: 589**
 – в сокращении мышц **2: 40, 589**
 – в фиксации азота **2: 507, 510**
 – в фотосинтезе **2: 404, 405, 415, 416**
 – в цикле Кальвина **2: 415, 416**
 – выход при окислении глюкозы **2: 201, 202**
 – гидролиз **1: 425; 2: 18, 31, 35, 37**
 --- и функция моторных белков **1: 256–262**
 --- биохимическое/химическое уравнение **2: 27**
 --- константа равновесия **2: 18**
 --- изменение свободной энергии **2: 16, 29, 31**
 – ингибирование пируваткиназы **2: 147**
 – комплексы Mg²⁺ **1: 308; 2: 27, 30**
 – концентрация **2: 30**
 – перенос фосфорильных групп **2: 28–43**
 – при гипоксии **2: 344**
 – регуляция в окислительном фосфорилировании **2: 343–346**
 – синтез **2: 327–342**
 --- в галофильных бактериях **2: 387, 388**
 --- при окислительном фосфорилировании **2: 343–346**
 --- при фотофосфорилировании **2: 381–384**
 --- регуляция **2: 347**
 – синтез сАМР **1: 427**
 АТРазы
 – AAA+ **3: 56**
 – F-типа **1: 563; 2: 331; см. также** АТР-синтаза
 – Na⁺/K⁺ в поляризации мембраны **1: 563, 633, 634, 635**
 – P-типа **1: 540, 541, 560, 561**
 – V-типа **1: 564**
 – в мембранном транспорте **1: 564, 565**
 – в нейронах **2: 590**
 – в сетчатке **1: 651**

АТР-синтаза **2: 327, 334, 351, 385**
 – в хлоропластах **2: 384**
 – конформация субъединиц **2: 333**
 – модель действия **2: 333–338, 384**
 – функциональные домены **2: 331**
 АТР-синтасома **2: 340**
 АТР-управляемые K⁺-каналы **2: 596**
Azotobacter vinelandii, фиксация азота **2: 512**
 AZT (азидотимидин) **3: 147**
 А-ДНК **1: 405**
 А-сайт **3: 197**

B

BAC (искусственная бактериальная хромосома) **1: 439, 442**
 BRCA1/2, и рак молочной железы **3: 80**
 В-ДНК **1: 405**
 В-клетки (В-лимфоциты) **1: 170**
 – рекомбинация **3: 96, 97**
bicoid **3: 273–275**
Bmp4 **3: 280**

C

C₂-путь **2: 422**
 C₃-растения **2: 423**
 C₄-путь **2: 422–425**
 C₄-растения **2: 423**
 Ca²⁺
 – концентрация в цитозоле/внеклеточных жидкостях **1: 634, 635**
 – осцилляции **1: 615, 618**
 Ca²⁺/кальмодулин-зависимые протеинкиназы **1: 614–616**
 Ca²⁺-каналы **1: 573, 580**
 – в метаболизме глюкозы **2: 596**
 – в передаче сигнала **1: 611, 616**
 – дефекты **1: 579, 581**
 Ca²⁺-насос **1: 560, 611, 616**
 – SERCA **1: 560, 561**
 сАМР (циклический аденозинмонофосфат) **1: 427**
 – гормональная регуляция **1: 599**
 – измерение методом FRET **1: 614, 615**
 – как вторичный мессенджер **1: 427, 607**
 – расщепление **1: 605, 609**
 – синтез под действием аденилатциклазы **1: 598, 599**
 – структура **1: 427**
 сАМР-зависимая протеинкиназа А (РКА) **1: 599, 604**
 сАМР-чувствительный элемент (CRE) **3: 268**

- cAMP-рецепторный белок (CRP) **3: 116**
 CAM-растения **2: 426**
 CASP, предсказание структуры белка **1: 212**
caudal **3: 275, 276**
 CDK9 **3: 120**
 CDP (цитидиндифосфат) **2: 471**
 CDP-диацилглицерин **2: 471–473**
 Celera Corporation **1: 458**
 CFP (голубой флуоресцентный белок) **1: 612–515**
 cGMP (циклический гуанозинмонофосфат)
 – роль в зрительной функции **1: 651–654**
 – структура **1: 627**
 cGMP-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа G) **1: 627**
 cGMP-фосфодиэстераза (PDE) **1: 628, 653**
 ChREBP-транскрипционный фактор **2: 150, 151**
Clostridium
 – *acetobutyricum* **2: 96**
 – *botulinum* **1: 549**
 – *perfringens* **1: 222**
 CMP (цитидинмонофосфат) **1: 394, 424; 2: 548**
 CO₂, см. Диоксид углерода
 CoA (кофермент А) **1: 426; 2: 183**
 CODIS база данных **1: 455, 457**
 COX (циклооксигеназа) **2: 461, 462**
 – ингибиторы **2: 461, 462**
 COX4 **2: 345, 346**
Crassulaceae, фотосинтез **2: 426**
 CREB **1: 608; 3: 268**
 CTF1 **3: 265, 266**
 C-белок **1: 260**
 C-концевой остаток **1: 128**
 –– посттрансляционные модификации **3: 206**
- D**
 Dam-метилаза **3: 58**
 – в репарации **3: 68**
 dAMP (дезоксиаденозинмонофосфат) **1: 394**
 dCMP (дезоксцитидинмонофосфат) **1: 394**
 DDI **3: 147**
 dGMP (дезоксигуанозинмонофосфат) **1: 393, 394**
 Dicer **3: 138, 270**
 DnaA-белок, в инициации репликации **3: 56–60**
 DnaB-хеликаза **3: 57–60**
 DnaC-белок, в инициации репликации **3: 57–60**
 DnaG-белок **3: 58**
 DnaK/DnaJ, в фолдинге белка **1: 212, 213**
 Drosha **3: 138, 270**
Drosophila melanogaster
 –– жизненный цикл **3: 272**
 –– регуляция генов **3: 272–278**
 dTMP (дезокситимидинмонофосфат) **1: 393, 394**
 D-плечо, в тРНК **3: 185**
- E**
E. coli, см. *Escherichia coli*
 E1, E2, E3 ферменты в расщеплении белков **3: 220, 221**
 eIF4-связывающие белки **3: 198, 199**
 ELISA (ИФА) **1: 255, 256; 2: 570**
env **3: 145, 146, 148, 176**
erbB2 онкоген **1: 670**
 ERK киназа **1: 327, 619, 621, 622, 625**
Escherichia coli **1: 20–24**
 –– F₁F₀-комплекс **2: 331, 335–338**
 –– *lac* оперон **3: 235–245**
 –– ДНК **1: 51**
 –– карта хромосомы **3: 44**
 –– клонирование **1: 434–480**
 –– липополисахариды **1: 370**
 –– метилирование ДНК **1: 419**
 –– молекулярный состав **1: 33**
 –– переносчик лактозы **1: 567, 568**
 –– плазмидные векторы **1: 439, 440**
 –– репликация **3: 50–65**
 –– рибосомы **3: 180, 184**
 –– РНКазы Р **1: 410; 3: 136, 141, 142**
 –– секвенирование генома **1: 61**
 –– сигнальные пути **1: 644, 645**
 –– синтез фосфолипидов **2: 472**
 –– транскрипция **3: 106–115**
 –– цикл лимонной кислоты и глиоксилатный цикл **2: 212, 214**
 –– шапероны **1: 213, 214**
 –– экспрессирующие векторы **1: 444, 445**
 EST (метка экспрессируемой последовательности) **1: 451**
 E-сайт, на рибосоме **3: 197**
- F**
 F₁F₀-комплекс *E. coli* **2: 331, 335–338**
 F₁-компонент АТФ-синтазы **2: 331, 332, 334–338**
 Fab-фрагмент иммуноглобулина **1: 251, 254**
 FAD (флавинадениндинуклеотид) **1: 426; 2: 54, 308**
 FADD-белок **1: 672, 673**
 Fas-рецептор, в апоптозе **1: 672, 673**
 Fc-фрагмент иммуноглобулина **1: 251**
 Fe-S-центр **2: 311, 368; см. также Железосерные кластеры**
 fMet-тРНК, в синтезе белка **3: 195–198**
 FMN (флавиномононуклеотид) **2: 54, 308**
 FOXO1-фактор **2: 151, 152**
 F₀-компонент АТФ-синтазы **2: 331, 335–338**
 FRAP (метод обесцвечивания флуоресценции) **1: 541, 542**
 FRET (флуоресцентный резонансный перенос энергии) **1: 609, 613–615**
 F-актин **1: 258, 260, 261**
- G**
gag **3: 144, 145**
 – сдвиг рамки считывания **3: 175–177**
gag-pol белок, и сдвиг рамки считывания **3: 175–177**
 GAL-гены, регуляция **3: 264, 265**
 Gal4p-белок **1: 467**
 –– кислый активирующий домен **3: 265**
 GAP-белки (активаторы GTPаз) **1: 601, 602, 658**
gap-гены **3: 273, 276**
 GATC-последовательность
 –– в репарации **3: 68–70**
 –– в репликации **3: 58**
 GDP (гуанозиндифосфат)
 – в β-адренергическом пути **1: 599–605**
 – при зрительном процессе **1: 652, 653**
 – при обонянии **1: 656**
 GEF (факторы обмена гуаниновых нуклеотидов) **1: 601**
Gemmata obscuriglobus **2: 509**
 GLUT1-переносчик **1: 553–555**
 GLUT2-переносчик **1: 556, 569**
 GLUT4-переносчик **1: 556**
 GMP (гуанозинмонофосфат) **1: 394, 424**
 GPI (глицозилфосфатидилинозит) **1: 530, 536, 537, 545**
 GPR14 **1: 478**
 Grb2 **1: 619, 625, 626, 629**
 GRK-киназы **1: 606, 607**
 GroEL/GroES **1: 19, 159**
 – в фолдинге **1: 213, 214**
 GSH, см. Глутатион

ГТФ (гуанозинтрифосфат) **1: 68, 424, 598, 599**

– в β -адренергическом пути **1: 597–605**

– и восприятие запаха и вкуса **1: 656, 657**

– и зрительный процесс **1: 652–654**

– синтез cGMP **1: 627**

ГТРазу активирующие белки (GAR) **1: 601, 602**

ГТРазы **1: 599, 601, 602, 605, 658**

G-актин **1: 258**

G-белки **1: 600–605, 658**

– G_i **1: 598, 608**

– G_{olf} **1: 656**

– G_q **1: 611**

– G_s **1: 598, 599, 608**

– Ras-типа **1: 600, 619**

– гаструдин **1: 656**

G-тетраплекс **1: 407**

Н

Halobacterium salinarum **2: 387, 388**

— бактериородопсин **1: 532, 533, 544**

HCR репрессор **3: 269**

Helicobacter pylori, лектины **1: 374, 375**

HIF-1 (индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор-1) **2: 81, 211, 345**

HIRA, в ремоделировании хроматина **3: 259**

his-оперон **3: 247**

HMG-CoA **2: 252**

– в синтезе холестерина **2: 480, 481**

HMG-CoA-редуктаза

– в синтезе холестерина **2: 480, 481, 491, 492**

– ингибиторы **2: 494, 495**

HMG-CoA-синтаза, в синтезе холестерина **2: 480, 481**

HOX-гены **3: 276, 277, 279**

HRE (элементы гормонального ответа) **1: 643; 3: 267, 268**

Hsp70, в фолдинге **1: 212, 213**

HU, в репликации **3: 56–58**

hunchback **3: 276**

I

IgA **1: 252**

IgD **1: 252**

IgE **1: 252, 253**

IgG **1: 251, 252, 254**

– рекомбинация генов **3: 96, 97**

IgM **1: 252**

Inr (инициаторная последовательность) **3: 117, 119, 261, 264**

IP₃ (инозит-1,4,5-трифосфат) **1: 507, 610, 611**

ISWI семейство, в ремоделировании хроматина **3: 259**

J

ЖАК (Янус-киназа) **1: 624; 2: 608**

ЖАК-STAT-путь **1: 624, 625; 2: 608**

J-сегмент легкой цепи **3: 96, 97**

L

L-19 IVS-рибозим **3: 140, 141**

lac-оперон **3: 235–245**

lac-промотор **3: 235–245**

Lac-репрессор **3: 235–245**

Lactobacillus bulgaricus, в ферментации **2: 96**

leu-оперон **3: 247**

LexA-репрессор, в SOS-реакциях **3: 249, 250**

LINE (длинные рассеянные повторы) **3: 14**

Lop-протеаза **3: 220**

LRP-рецептор **2: 491**

M

MALDI-масс-спектрометрия **1: 149**

МАРК-киназы **1: 622, 632**

— каскад **1: 622**

MCM-белки **3: 64, 65**

MDR1-переносчик **1: 564**

МЕК-протеинкиназа **1: 619, 622**

MFP-белок **2: 248**

MFS-факторы, облегчающие транспорт **1: 568**

MjTyrRS **3: 192–194**

*MjT*РНК^{Тyг} **3: 192–194**

MODY (сахарный диабет взрослого типа у молодых) **2: 152, 153, 355**

MutH в репарации ДНК **3: 68–71**

MutL в репарации ДНК **3: 68–71**

MutS в репарации ДНК **3: 68–71**

M-белок **1: 260**

N

Na⁺/K⁺-АТРаза **1: 560, 562, 563; 2: 40**
– в нейронах **2: 590**

– в поляризации мембраны **1: 633, 634**

– в сетчатке **1: 651**

Na⁺-глюкозный симпорт **1: 569, 570**

NAD⁺ (никотинамидадениндинуклеотид) **1: 426; 2: 50, 454**

– в цикле Кальвина **2: 415**

NADH

– в гликолизе **2: 80**

– дегидрогеназные реакции **2: 51, 52**

– окисление в митохондриях растений **2: 326**

– поглощение света **2: 50**

– шаттл-системы **2: 340–342**

NADH-дегидрогеназа **2: 308, 313, 314**

NADH-убихинон-оксидоредуктаза (комплекс I; NADH-дегидрогеназа) **2: 314**

NADP⁺ **2: 50**

– дегидрогеназные реакции **2: 51, 52**

– недостаточность витаминной формы **2: 53, 54**

NADPH **2: 307, 308, 454**

– в защите клеток от активных форм кислорода **2: 107, 108, 324**

– в пентозофосфатном пути **2: 107–111**

– в распределении глюкозо-6-фосфата **2: 112**

– в реакциях анаболизма **2: 447**

– в синтезе глицеральдегид-3-фосфата **2: 410, 411**

– в синтезе жирных кислот **2: 447–455**

– в фотосинтезе **2: 358, 359, 415, 416**

– в цикле Кальвина **2: 415, 416, 418**

– дегидрогеназные реакции **2: 51, 52**
– синтез **2: 454**

nanos **3: 276**

Neu5Ac (сиаловая кислота) **1: 350, 372, 373, 376, 502**

NLS (сигнал ядерной локализации) **3: 216, 217**

NO-синтаза **1: 628; 2: 576**

NS-домен **1: 364–366**

NuA4, в ремоделировании хроматина **3: 259**

NURF, в моделировании хроматина **3: 259, 260**

O

OmpLA, структура **1: 536**

OmpX, структура **1: 536**

ORC-комплекс **3: 64**

oriC (точка начала репликации) **3: 44, 56–58**

P

p53 **1: 665**

– мутации **1: 670**

P/2e⁻ коэффициент **2: 338**

P/O отношение **2: 338**

Paramesium **1: 526**

PCNA **3: 65**

PKD1 **1: 622**

pH **1: 92**

– буферов **1: 97**

– в биологических системах **1: 96**

– в связывании кислорода гемоглобином **1: 244**
 – оптимум для ферментов **1: 102, 303**
phe-оперон **3: 247**
 pI (изоэлектрическая точка) **1: 125, 126**
 – аминокислот **1: 116**
 – определение **1: 136**
 pK_a **1: 94–98**
 – R-групп аминокислот **1: 116, 125**
 – определение по кривой титрования **1: 124, 126**
Plasmodium falciparum **2: 107**
 Pol I, см. РНК-полимераза I
 Pol II, см. РНК-полимераза II
 Pol III, см. РНК-полимераза III
pol-ген **3: 145, 146, 148**
 PPAR (активируемые пролифераторами пероксисомные рецепторы) **2: 612, 613**
 pRb (белок ретинобластомы) **1: 596, 665, 670**
Propionibacterium freudenreichii, в ферментации **2: 96**
 РТРС **2: 350**
pumilio **3: 275, 276**
 Р-сайт **3: 197**

R

R_2C_2 комплекс протеинкиназы **1: 599, 604, 615**
 Raf-1 **1: 619, 622**
 RAG-белки **3: 97, 98**
 Rap GTPаза **3: 216, 217**
 Ra-белок **1: 600, 601, 619**
 — мутации **1: 670**
 — переключатели **1: 600**
ras-онкоген **1: 670, 671**
Rb-ген **1: 670, 671**
 — белок **1: 665**
 RecA **3: 86–89**
 – в SOS-ответе **3: 78**
 RecBCD фермент **3: 85, 86, 89**
 RF-1 **3: 179, 202, 204**
 RF-2 **3: 179, 202, 204**
 RFA **3: 65**
 RFC **3: 65**
 RGS-белки **1: 601, 658**
Rhodobacter sphaeroides **2: 368, 369**
Rhodospseudomonas viridis **2: 368, 369**
Rhodospirillum rubrum **2: 367, 408**
 RS-номенклатура стереоизомеров **1: 36, 37, 39**

RU486 (мифепристон) **1: 644**
 RuvA-белок **3: 85, 89**
 RuvB-белок **3: 85, 89**
 RuvC-белок **3: 85, 89, 93**
 R-состояние гемоглобина **1: 235**

S

ΔS (изменение энтропии) **1: 44, 212, 282**
Saccharomyces cerevisiae, см. Дрожжи
Salmonella typhimurium **3: 254**
 — липополисахариды **1: 370**
 SCOP, база данных **1: 202–205**
 SDS, см. Додецилсульфат натрия
 SecA/B-шапероны **3: 218**
 SELEX-метод **3: 154, 155**
 SERCA-насос **1: 560, 561**
 SH2-домен **1: 619, 622, 624, 625**
 SINE **3: 177, 178**
 S_N1 -механизм **1: 312, 313**
 S_N2 -механизм **1: 312, 313**
 SNAP25 **1: 548**
 SNARE-белки **1: 548**
 SNP (полиморфизм одного нуклеотида) **1: 460**
 SOS-ответ **3: 249**
 Sp1, домены **3: 265, 266**
 Src **1: 619, 630**
 SREBP, транскрипционный фактор **2: 151**
 SRP (сигнал-распознающая частица) **3: 211, 212**
 STAT, транскрипционные факторы **1: 624–627**
Streptococcus pneumoniae **1: 400**
Streptomyces lividans **1: 536, 575**
 SWI/SNF, в ремоделировании хроматина **3: 259, 260, 265**
 SWR1, в ремоделировании хроматина **3: 259, 260**

T

T_3 (триiodтиронин) **2: 575**
 T_4 (тироксин) **2: 575**
 TATA-бокс **3: 112, 118, 119**
 TATA-связывающий белок (ТВР) **3: 118–120**
 ТуС-плечо тРНК **3: 185**
 Тер-последовательность **3: 62, 63**
Tetrahymena thermophila **3: 127, 139, 140, 151**
 TFII **3: 118–121**

Ti-плазмида, в клонировании растений **1: 469–471**
 TRF1 **3: 150, 151**
 TRF2 **3: 150, 151**
Trp-оперон, аттенуация транскрипции **3: 246–249**
 Trp-репрессор **3: 247**
Trypanosoma brucei rhodesiense **2: 541**
 t-SNARE **1: 548**
 TUF PHK **3: 157**
 Tus-Тег комплекс **3: 63**
 Т-ДНК, в клонировании растений **1: 471**
 Т-клетки **1: 249, 250**
 – рецепторы **1: 250**
 Т-петля **3: 150, 151**
 Т-состояние гемоглобина **1: 235**
 Т-хелперы (Т_H-клетки) **1: 250**

U

UAS (активаторная последовательность) **3: 261**
ubx **3: 277**
 UDP (уридиндифосфат) **2: 89, 435**
 UDP-глюкоза **2: 16, 89**
 – в синтезе гликогена **2: 161–163**
 — сахарозы **2: 428, 429**
 — целлюлозы **2: 432–434**
 UDP-глюкозопиروفосфорилаза **2: 161, 429**
ultrabithorax **3: 277**
 UMP (уридин-5'-монофосфат) **1: 394; 2: 547**
 Уни белки, в репарации ДНК **3: 77, 78**
 UTP (уридинтрифосфат) **1: 48**
 UvrA, в репарации ДНК **3: 74, 78**
 UvrB, в репарации ДНК **3: 74, 78**
 UvrC, в репарации ДНК **3: 74, 78**
uvrD, в репарации ДНК **3: 78**

V

v-SNARE **1: 548**

X

XerCD система **3: 93**
 X-сцепленная аденолейкокодистрофия (XALD) **2: 246**

Z

Z-диск **1: 259–261**
 Z-ДНК **1: 405**
 Z-схема **2: 372, 373**

A

Абзимы, см. Каталитические анти-тела

Абиотический синтез **1: 56**

Абсолютная конфигурация **1: 117**

Абсолютная температура, единицы **1: 276**

Авандия **2: 470, 612, 617**

Авидин **2: 207, 338**

Авогадро число **2: 13**

Автономно реплицирующиеся последовательности (АРП) **3: 64**

Автотрофы **2: 5–7**

Агар **1: 359**

Агароза **1: 359, 362**

Агрекан **1: 366, 367**

Агонисты рецепторов **1: 597**

Адаптерная гипотеза **3: 166, 167**

Адаптерные белки, в сигнальных путях **1: 617, 629**

Адгезионные молекулы **1: 372, 549**

Аденилаткиназа **2: 41, 550, 610**

Аденилатциклаза **1: 326, 427, 599, 602–604, 608**

Адениллитрансфераза **2: 515, 516**

Аденилирование **2: 38, 515, 516**
– ферментов **1: 324**

Аденин, **1: 392, 399; 2: 544**
– биосинтез **2: 557, 574**
– дезаминирование **1: 416**
– клеточная концентрация **2: 30**
– регуляция метаболизма **2: 129–131**
– транслוקаза **2: 339**
– эволюционное значение **3: 152, 153**

S-Аденозилгомоцистеин **2: 284**

S-Аденозилметионин (AdoMet) **2: 284**
– в качестве мутагена **1: 323**
– синтез **2: 294**

Аденозин **1: 394**
– анти-форма **1: 404**
– как кофактор ферментов **1: 425, 426**
– метилирование **1: 419**
– син-форма **1: 404**
– эволюционное значение **1: 425**

Аденозин-3',5'-циклический монофосфат, см. cAMP

Аденозин-2',3'-циклический монофосфат **1: 394**

Аденозин-2'-монофосфат **1: 395**

Аденозин-3'-монофосфат **1: 394**

Аденозин-5'-монофосфат **1: 394; см. также AMP**

Аденозиндеаминаза **2: 556**
– генная терапия при недостаточности **1: 475**

Аденозиндифосфат, см. ADP

Аденозинтрифосфат, см. ATP

Аденозинфосфорибозилтрансфераза **2: 556**

Адипозная ткань, см. Белая жировая ткань, Бурая жировая ткань

Адипокины **2: 605**

Адипонектин **2: 610–612, 617**

Адиопоциты **1: 491, 492; 2: 585–587, 605**
– синтез NADH **2: 454**

Адреналин **1: 597, 598; 2: 173, 539, 602**
– в метаболизме глюкозы **2: 539**
– липидов **2: 539**
– как нейромедиатор и гормон **2: 566**
– как усилитель сигнала **2: 570, 578**
– каскадный механизм **1: 606; 2: 166**
– регуляция **1: 597, 598**
– синтез **2: 539**
– синтетические аналоги **1: 597**

Адренергические рецепторы **1: 597**
– в рафтах **1: 632**
– десенсibilизация **1: 606, 607**
– киназа (ARK) **1: 327**

Адренолейкодистрофия **2: 246**

Адсорбционная хроматография **1: 515, 516**

Азасерин **2: 558**

Азидотимидин (AZT) **3: 147**

Азот
– включение в аминокислоты **2: 513**
– восстановление до аммиака **2: 510–513**
– выведение **2: 273**
– круговорот в биосфере **2: 6**
– метаболизм **2: 510–517**
– оксид, см. Моноксид азота
– растворимость в воде **1: 79**
– фиксация нитрогеназным комплексом **2: 510–513**
– цикл **2: 506**

Азотистая кислота как мутаген **1: 418**

Азотистые основания **1: 392; см. также Пурины; Пиримидины**
– спаривание **1: 399**

Азотистый иприт **1: 418**

Аквапорины **1: 556, 571–573**

Аконитаза (аконитатгидратаза) **2: 192–195**
– «скрытая функция» **2: 193**

цис-Аконитат **2: 192**

Акридин **3: 121, 122**

Активаторная последовательность (UAS) **3: 261**

Активаторы транскрипции **3: 232**

Активационный барьер **1: 47, 48**

Активный транспорт **1: 558, 567**
– вторичный **1: 558**
– первичный **1: 558**
– роль ATP **2: 339, 593**

Активный центр **1: 273**
– комплементарность переходному состоянию **1: 278**

Активные формы кислорода (АФК) **2: 324, 345**

Актин **1: 258–261**
– филаменты **1: 24, 258–261**

α-Актинин **1: 259**

Актиномицин D **3: 121**

Актос (пиоглитазон) **2: 612, 617**

Акцепторный контроль **2: 343**
– коэффициент **2: 343**

Аланил-глутамил-глицил-лизин **1: 129**

Аланин **1: 34; 2: 70**
– в транспорте аминокрупп в печень **2: 271**
– расщепление до пирувата **2: 70, 100, 584**
– свойства **1: 179; 2: 581**
– стереоизомеры **1: 37, 115, 117**
– структура **1: 34**

Аланинаминотрансфераза (АЛТ) **2: 269, 271**

Алкалоз **1: 93**

Алкаптонурия **2: 292**

Алкены **2: 46**

Алкилирующие агенты как мутагены **1: 418**

Алкогольдегидрогеназа **1: 297; 2: 53, 250**

Аллантоин **2: 556**

Аллели **1: 246, 455, 670**
– АРОЕ, при болезни Альцгеймера **2: 487**

Аллигаторы, анаэробный метаболизм **2: 92**

Аллоза **1: 342**

Аллопуринол **2: 557**

Аллостерическая регуляция
– аспартаткарбамоилазы **2: 548, 549**
– биосинтеза аминокислот **2: 529–531**
– глутаминсинтетазы **2: 529, 530**
– метаболизма жиров **2: 173**
– метаболизма углеводов **2: 171–173**
– образования ацетил-СоА **2: 208, 209**

Аллостерические белки **1: 237**

Аллостерические модуляторы **1: 319–322**

- Аллостерические ферменты
1: 319–323
- Аллостерические эффекторы 1: 319
- Алпер Тиква 1: 218
- АЛТ, см. Аланинаминотрансфераза
- Альбертс Альфред 2: 494, 495
- Альбинизм 2: 287
- Альбумин
– в сыворотке 2: 230, 536, 584, 592
– ген 3: 131
- Альдегиддегидрогеназа 2: 250
- Альдегиды 1: 31, 340
– и полуацетаты 1: 343, 344
– и полукеталы 1: 343, 344
- Альдогексозы 1: 341, 342
- Альдозы 1: 341–344
- Альдолазы 2: 73, 74, 128
– в цикле Кальвина 2: 412, 413
– классы 2: 73, 74
- Альдольная конденсация 1: 23
- Альдостерон 1: 509
- Альтроза 1: 342
- Альцгеймера болезнь
– аполипопротеины 2: 487
– отложение амилоида 1: 215, 216
- α -Амантин 3: 122
- Амарил 2: 597
- Амиды, стандартное изменение свободной энергии 2: 16
- Амилаза 1: 355 2: 86, 87
- Амилоза 1: 353–355, 358; см. также Крахмал
- Амилоид 1: 215–217
- Амилоидоз 1: 215–217
- Амилопектин 1: 353–355, 358; 2: 87, 428; см. также Крахмал
- Амилопласты 2: 405, 406
- Аминоацил-связывающий (А) сайт рибосомы 3: 197
- Аминоацил-тРНК 3: 179, 186
- Аминоацил-тРНК-синтетазы 3: 179, 186
- α -Аминогруппы, перенос на α -кетоглутарат 2: 263, 266
- Аминокислотная последовательность 1: 33, 53, 142–148
– в эволюционном анализе 1: 156–160
– гомологии 1: 158, 462, 483
– консенсусная 1: 155, 156
– определение 1: 142–152
– методы масс-спектрометрии 1: 148–151
– по Сенгеру 1: 145
– по Эдману 1: 145
– синтез коротких пептидов 1: 152, 153
– соответствие последовательности ДНК 1: 151, 152
- Аминокислотные остатки 1: 33, 38
– С-концевые 1: 128
– N-концевые 1: 128, 144, 145
– изопренелирование 3: 207
– и продолжительность жизни белка 3: 221, 222
– последовательность 1: 142–148
– фарнезилирование 3: 207
– фосфорилирование 1: 324–327
- Аминокислоты 1: 113–127; 2: 278; см. также названия аминокислот
– 20 основных 1: 119
– R-группы 1: 114, 118–120
– активация, в синтезе белка 3: 179
– биосинтез 2: 518–532
– в α -спиралях 1: 177–181
– в β -структурах 1: 181–183
– глюкогенные 2: 104, 105, 280, 281
– заменимые 2: 278
– как амфолиты 1: 123
– катаболизм 2: 261–298
– генетические нарушения 2: 287, 290–292
– кетогенные 2: 280, 281
– кислотно-основные свойства 1: 126, 127
– кодоны 3: 167, 191–194
– кривые титрования 1: 123–126
– незаменимые 2: 278
– нестандартные 1: 120–123
– образование пептидной связи 1: 127
– окисление 2: 261–294
– полярность 1: 118
– с разветвленной цепью, отсутствие расщепления в печени 2: 296, 297
– сокращенные названия 1: 115
– стереоизомеры 1: 38, 115–118
– цвиттер-ионы 1: 123
- δ -Аминолевулилат, биосинтез 2: 533
- γ -Аминомасляная кислота (ГАМК) 2: 272, 539
– рецепторы как ионные каналы 1: 579, 640
- Аминопептидазы 2: 264
- Аминоптерин 2: 558
- Аминосакхара 1: 346, 360
- Аминотрансферазы 2: 266, 267; см. также Трансаминазы
– пиридоксальфосфат как простетическая группа 2: 266, 267
- Амины 1: 31
– как продукты декарбоксилирования аминокислот 2: 268, 538, 539
- Аммиак
– в метаболизме азота 2: 6, 506–509
– аминокислот 2: 262–264
– в образовании мочевины 2: 273, 274
– высвобождение глутаматом 2: 269
– перенос аланином 2: 270, 271
– токсичность 2: 270, 272, 278
- Аммонийотелические виды 2: 273
- Аммония цианид 3: 152
- Амоксициллин 1: 317
- Амплификация ДНК методом ПЦР 1: 452
- Амфибилические пути 2: 203
- Амфитропные белки 1: 530, 531
- Амфифильные соединения 1: 78, 81, 496
- Амфолиты 1: 123, 127
- Амфотерные аминокислоты 1: 123
- Анаболизм 1: 48, 49; 2: 7
– цикл лимонной кислоты 2: 182, 203
- Анаболические пути 2: 8, 9, 582, 610
– в метаболизме углеводов 2: 403, 582
– перенос энергии 2: 7, 404, 454
- Аналит 1: 149
- Анаммокс 2: 507–509
- Анаммоксосомы 2: 508, 509
- Анандамид 1: 622
- Анаплеротические реакции, в цикле лимонной кислоты 2: 188, 203–205
- Анаэробные бактерии, неполный цикл лимонной кислоты 2: 202
- Анаэробный метаболизм у целакантов 2: 92
- Ангидриды кислот, стандартное изменение свободной энергии 2: 16, 29
- Ангстрем (Å) 1: 177
- Андерсена болезнь 2: 159
- Андрогены 2: 495
– синтез 2: 575
- Анемия
– мегалобластная 2: 284
– пернициозная, роль витамина В₁₂ 2: 284
- Анионообменивающий (АЕ) белок 1: 557
- Анионообменник 1: 132; см. также Ионообменная хроматография
- Аничков Н. Н. 2: 493
- Анкирин 1: 543
- Аннотирование генов 1: 62
- Аномальные трихроматы 1: 656
- Аномерный углерод 1: 344, 350, 351
- Аномеры 1: 344

- Анорексигенные нейроны **2: 607–609**
 Анри Виктор **1: 286**
 Антагонисты рецепторов **1: 597, 644**
 Антеннапедии **3: 278, 279**
 Антенны хлорофиллов **2: 304, 362, 365, 366, 369–377**
 Антибиотики
 – ингибирование гликозилирования белков **3: 213, 214**
 – ингибиторы топоизомераз **3: 24**
 – ингибиторы транскрипции **3: 121, 122**
 – ингибиторы трансляции **3: 208, 209**
 – механизм действия **1: 314–317, 570; 2: 560; 3: 208, 209**
 – перенос генов устойчивости на плаزمиды **1: 21, 439, 471; 3: 10**
 – устойчивость бактерий **1: 157**
 Антигенная вариабельность **3: 256**
 Антигенная детерминанта (эпитоп) **1: 250**
 Антигены **1: 250**
 – взаимодействие с антителами **1: 249–251**
 Антидиуретический гормон (вазопрессин) **2: 576–578**
 Антикодон **3: 173**
 Антипорт **1: 370, 380; 2: 411, 416**
 – Na^+/K^+ -АТРаза **2: 590**
 – в мембранном транспорте в нейронах **2: 590**
 – в сетчатке **1: 651–653**
 – роль в поляризации мембраны **2: 339, 340**
 – для триозофосфатов **2: 417, 418**
 Антитела **1: 249, 251; см. также**
 Иммуноглобулины
 – в анализе **1: 254–256**
 – как результат рекомбинации **3: 96, 97**
 – каталитические **1: 307, 308**
 – моноклональные **1: 254**
 – поликлональные **1: 254**
 – разнообразие **1: 250**
 – специфичность связывания **1: 253**
 Анфинсен Кристиан **1: 209, 210**
 Апоаконитаза **2: 193**
 Аполипопротеины **2: 228, 485–489**
 – в болезни Альцгеймера **2: 487, 488**
 – редактирование РНК **3: 176–178**
 Апопротеин **1: 272**
 Апоптоз **1: 672, 673**
 – липоапоптоз **2: 616**
 – роль митохондрий **2: 347, 350**
 – роль цитохрома P-450 **2: 347**
 – фактор активации Araf-1 **2: 350**
 Апоптосома **2: 350**
 Апофермент **1: 272**
 Аппетит, гормональный контроль **2: 605–610**
 Аптамеры **3: 154, 155, 254**
 Арабиноза **1: 343**
 Арахидовая кислота **1: 489**
 Арахидонат **1: 508; 2: 461–463**
 Арахидоновая кислота **1: 508; 2: 572**
 Арбер Вернер **1: 435**
 Аргиназа **2: 273, 520**
 Аргинин **1: 116**
 – биосинтез **2: 519–521**
 – в синтезе оксида азота **2: 542, 576**
 – превращение в α -кетоглутарат **2: 292**
 – свойства **1: 116**
 Аргининемия **2: 287**
 Аргининосукцинат **2: 273, 275**
 Аргининосукцинатная ацидемия **2: 287**
 Аргининосукцинатсинтаза **2: 273, 275**
 Арнон Даниэль **2: 382**
 Ароматические аминокислоты, *см. также* Аминокислоты
 – в биосинтезе веществ в растениях **2: 523, 526**
 Аррестины
 – 1 **1: 654**
 – 2 (β -аррестин) **1: 606, 607, 654**
 Археи **1: 18–20**
 – мембранные липиды **1: 496, 500, 501**
 Асимметрия молекул **1: 184**
 Аскорбат **1: 190, 191**
 Аскорбиновая кислота, *см.* Витамин С
 Аспарагин **1: 114, 116; 2: 278, 304, 518, 523**
 – расщепление до оксалоацетата **2: 104, 297**
 – свойства **1: 116, 120**
 Аспарагиназа **2: 523**
 Аспарагиновая кислота **1: 116; 2: 304, 518, 523**
 Аспартам **1: 39, 69, 129**
 Аспаргат **1: 78, 116, 120; 2: 274, 523, 531**
 – в C_4 -пути **2: 424, 425**
 – расщепление до оксалоацетата **2: 297**
 – свойства **1: 116, 120**
 – синтез пиримидинов **2: 544, 547, 548**
 Аспартаминотрансфераза (АСТ) **2: 267, 269, 274**
 Аспаргат-аргининосукцинатный шунт **2: 276**
 Аспаргаттранскарбамоилаза **1: 321; 2: 548, 549**
 Аспирин **2: 461–463; см. также** Ацетилсалициловая кислота
 Астбери Уильям **1: 177**
 Атеросклероз **2: 493, 494**
 – роль *транс*-жирных кислот **1: 494**
 Атом
 – электроотрицательность **1: 70, 75, 76, 304**
 – водорода, в переносе электронов **2: 46**
 Атомная масса, единицы **1: 32**
 Атомно-силовая микроскопия **1: 544**
 Атриальный натрийуретический фактор (ANF) **1: 627**
 Аттрактанты **1: 645**
 Ауксины **1: 470; 2: 538**
 Аутокринные гормоны **2: 571, 605**
 Аутосплайсирующиеся интроны **3: 125, 140, 153**
 Аутофосфорилирование, *см. также* Фосфорилирование
 – в бактериях **1: 645**
 – в проведении сигнала инсулина **1: 621**
 – в растениях **1: 648, 649**
 – в сигнальных путях **1: 625**
 Африканская сонная болезнь (трипаномоз) **1: 540–542**
 Аффинная хроматография **1: 135, 379, 447**
 Ахиральные молекулы **1: 35**
 Ацеталь **2: 343, 348**
 Ацетальдегид **2: 49**
 Ацетат
 – активированный **2: 199–203**
 – в синтезе жирных кислот **2: 213, 214**
 – в синтезе холестерина **2: 480, 481**
 – как источник фосфоенолпирувата **2: 212**
 – транспорт **2: 213, 214**
 Ацетил-СоА **1: 426**
 – в метаболизме глюкозы **2: 582**
 – в синтезе жирных кислот **2: 446–456**
 – в синтезе холестерина **2: 480**
 – гидролиз **2: 34**
 – метаболизм в печени **2: 252, 582, 583, 584**
 – образование при β -окислении **2: 235**
 – окисление в цикле лимонной кислоты **2: 237**
 – окисление пирувата **2: 183**
 Ацетил-СоА-АСР-трансфераза **2: 450**

- Ацетил-СоА-карбоксилаза
 – в бактериях **2: 457**
 – в растениях **2: 457**
 – в синтезе жирных кислот **2: 151, 243, 446, 457**
- N-Ацетилгалактозамин **1: 390**
- N-Ацетилглутамат в синтезе мочевины **2: 277**
- N-Ацетилглутаматсинтаза **2: 277, 279**
- N-Ацетилглюкозамин **1: 311, 313, 490**
 – в синтезе пептидогликанов **2: 435**
- Ацетилен **2: 45**
- Ацетил-кофермент А, см. Ацетил-СоА
- N-Ацетилмурамовая кислота **1: 311, 313, 347**
 – в синтезе пептидогликанов **2: 435**
- N-Ацетилнейраминавая кислота **1: 311, 313, 376**
 – в ганглиозидах **2: 502**
- Ацетилсалициловая кислота (аспирин) **2: 461, 462**
- Ацетилхолиновый рецептор **1: 578, 579, 638**
 – в передаче сигнала **1: 635, 636**
 – дефекты **1: 581**
 – открытая/закрытая конформация **1: 579**
 – синаптическая агрегация **1: 542**
 – структура **1: 638**
- Ацетоацетат **2: 63, 85, 251–252**
- Ацетоацетатдекарбоксилаза **2: 252**
- Ацетоацетил-АСР **2: 450, 451**
- Ацетоацетил-СоА **1: 425; 2: 252, 253**
- Ацетогруппа
 – в синтезе жирных кислот **2: 213, 214**
 – транспорт **2: 213, 214**
- Ацетон **2: 466, 603**
 – при диабетическом кетоацидозе **2: 603**
- Ацивин **2: 558**
- Ацивицин **2: 558**
- Ацидемия
 – аргининосукцинатная **2: 287**
 – метилмалоновая **2: 287, 295**
- Ацидоз **1: 93, 102; 2: 254, 604**
 – диабетический **2: 603, 604**
- Ацикловир **3: 166**
- Ацил-СоА
 – в превращениях жирных кислот **2: 231**
 – производные жирных кислот **2: 230, 231**
 – в синтезе триацилглицериннов **2: 464–466**
- Ацил-СоА-ацетилтрансфераза **2: 235**
- Ацил-СоА-ацилтрансфераза (тиолаза) **2: 235**
- Ацил-СоА-дегидрогеназы **2: 234, 237, 316**
 – генетические дефекты **2: 245**
 – средней цепи (MCAD) **2: 245**
- Ацил-СоА-десатураза **2: 458**
- Ацил-СоА-синтаза **2: 230, 231**
 – в синтезе триацилглицериннов **2: 465**
- Ацил-СоА-холестеринацил-трансфераза (ACAT) **2: 485, 492**
- Ацилкарнитинновый переносчик **2: 231, 232**
- Ацилпереносящий белок (АСР) **2: 449, 450**
- N-Ацилсфинганин **2: 476, 478**
- N-Ацилсфингозин **2: 476, 478**
- Ацилферменты **1: 302, 305**
- Ацилфосфат **2: 33, 76**
- Аэробные организмы, эволюция **1: 60**
- Аэробный метаболизм, у мелких позвоночных **2: 92**
- Аэролизин k **1: 150**
- Б**
- Базы данных
 – белковых структур **1: 431, 463**
 – геномные **1: 444, 449, 457, 459, 462, 466**
- Бактериальный геном **3: 10, 11**
 – секвенирование **1: 458, 459**
- Бактерии **1: 19–24; см. также Escherichia coli**
 – аминокислотный состав **2: 538**
 – анаэробные, фиксация азота **2: 507–509**
 – галофильные, синтез АТР **2: 387–389**
 – гетерополисахариды клеточной стенки **1: 358**
 – грамотрицательные **1: 21**
 – грамположительные **1: 21**
 – зеленые серные **2: 368, 386**
 – калиевые каналы **1: 575, 576**
 – лектины **1: 374**
 – липополисахариды **1: 370**
 – пурпурные **1: 60, 532, 544; 2: 367, 369, 386**
 – регуляция экспрессии **3: 243–256**
 – репликация ДНК **3: 45–66**
 – синтез гликогена **2: 427**
 – синтез пептидогликанов **2: 433–435**
 – синтез целлюлозы **2: 433**
 – устойчивость к антибиотикам **1: 316, 317**
- эндосимбиотические **1: 59, 60**
 – эволюция хлоропластов **2: 386**
 – эволюция митохондрий **2: 352**
- Бактериородопсин **1: 222; 2: 388, 389**
 – как световой протонный насос **1: 84, 2: 389**
 – микроскопический анализ **1: 544**
 – структура **1: 532**
- Бактериофаг λ **1: 435, 440–442; 3: 91, 92**
- Баллард Джон **2: 468**
- Балтимор Дэвид **3: 144, 145**
- Бантинг Фредерик **2: 568**
- Бевацизумаб (авастин) **1: 669**
- Бекстра **2: 462, 463**
- Белая жировая ткань **2: 585–588**
- Белки **1: 132–262**
 – аллостерические **1: 237**
 – аполипопротеины **2: 485–487**
 – базы данных **1: 193, 203–205**
 – биосинтез **3: 178–209**
 – время полужизни **2: 125, 582, 512**
 – вторичная структура **1: 141, 177–183**
 – глобулярные **1: 185, 192–205**
 – гомологичные **1: 61**
 – денатурация **1: 208, 209**
 – домены **1: 200**
 – железо-серные **2: 309, 310**
 – Рискс **2: 310, 317, 376**
 – закоривающие киназу А (АКАР) **1: 604, 608, 609, 616, 617**
 – зимогены **1: 328, 329**
 – иммунной системы, см. Иммуноглобулины
 – каталитические, см. Ферменты
 – кислород-связывающие **1: 226–246**
 – классификация по структурным признакам **1: 203, 204**
 – конформация **1: 172**
 – конъюгированные **1: 363–369**
 – липопротеины **2: 485–487**
 – мембранные, см. Мембранные белки
 – методы выделения и анализа **1: 132–140, 149–152, 184, 196–199**
 – мотивы укладки **1: 200–205; 3: 239–242**
 – моторные **1: 256–262**
 – мультимерные **1: 205**
 – мультисубъединичные **1: 130**
 – мультифункциональные **2: 248**
 – нативные **1: 172**
 – олигомерные **1: 130**
 – ортологичные **1: 61**
 – паралогичные **1: 61**
 – первичная структура **1: 141–148**

- плазмы крови **2: 485, 591, 592**
- полиморфные **1: 142**
- посттрансляционный процессинг **3: 180, 208**
- пробелки **1: 328**
- протеолитическая активация **1: 319, 328, 329**
- протомерные **1: 130**
- разобзающий, см. Термогенин
- регуляторные **3: 237–242**
- ренатурация **1: 209**
- рибосомные **3: 180, 250, 251**
- с высокой электрофоретической подвижностью (HMG) **3: 262**
- свертывание (фолдинг) **1: 210–215**
- нарушения **1: 215–218**
- семейства и суперсемейства **1: 203**
- слияния **1: 547**
- сложные **1: 131**
- стабильность **1: 172**
- третичная и четвертичная структура **1: 141, 184–208**
- трифункциональный **2: 235**
- фибриллярные **1: 185–192**
- флавопротенны **2: 54, 55**
- фосфорилирование/дефосфорилирование **2: 127**
- Белые клетки крови (лейкоциты) **2: 592**
- Белые мышцы **2: 587**
- Бензоаты **2: 278**
- Бензоил-СоА **2: 278**
- Берг Пол **1: 433, 438**
- Бергстрем Суне **1: 508**
- Берсон Соломон **2: 569**
- Бест Чарлз **2: 568**
- Бидл Джордж **2: 193; 3: 8**
- Бикарбонат **1: 79**
- буферные свойства **1: 99–101**
- образование **1: 242, 556**
- Биливердин **2: 535**
- Билирубин **2: 535, 536**
- Биоинформатика **1: 115, 156, 212**
- Биолюминесценция, цикл у светлячков **2: 39**
- Биомолекулы
 - амфифильные **1: 78, 81**
 - асимметричные **1: 35**
 - конформация **1: 38**
 - макромолекулы **1: 31**
 - молекулярная масса **1: 32**
 - происхождение **1: 55, 56**
 - стереоспецифичность **1: 37, 38**
 - функциональные группы **1: 29, 30**
 - хиральные **1: 35**
- Биотин **2: 205, 207, 281**
- в пируваткарбоксилазной реакции **2: 100, 101, 205–207**
- в реакции ацетил-СоА-карбоксилазы **2: 446, 447**
- в синтезе фосфоенолпирувата из пирувата **2: 100**
- недостаточность **2: 207**
- Биохимические реакции
 - внутримолекулярные перегруппировки **2: 23**
 - изомеризация **2: 23, 24**
 - и химические реакции **2: 27, 28**
 - нуклеофильные **2: 21**
 - окислительно-восстановительные **2: 26; см. также** Окислительно-восстановительные реакции
 - распространенные типы **2: 20–26**
 - расщепление связи **2: 20, 21**
 - свободнорадикальные **2: 24, 25**
 - с переносом групп **2: 25**
 - электрофильные **2: 21**
 - элиминирование **2: 23, 24**
- Биоцитин **2: 63**
- Биоэнергетика **1: 44; 2: 13**
- Бисульфиты, мутагенные свойства **1: 418**
- Бисфосфаты **2: 73**
- 1,3-Бисфосфоглицерат **2: 202**
- гидролиз **2: 32**
- синтез **2: 76, 79**
- 2,3-Бисфосфоглицерат, в связывании гемоглобина с кислородом **1: 245**
- Бишоп Майкл **3: 146**
- Блобел Гонтер **3: 210**
- Блох Конрад **2: 445, 484**
- Богатый глутамином домен **3: 265, 266**
- Бойер Герберт **1: 433**
- Бойер Поль **2: 336, 338**
- Больцмана константа **2: 13**
- Большая бороздка **1: 401**
- Бор Кристиан **1: 243**
- Бор Нильс **1: 243**
- Бора эффект **1: 243**
- Борьба или бегство, реакция **1: 173, 602, 603**
- α/β -Бочонок **1: 451, 200, 202**
- Брассинолид **1: 509, 647**
- Брассиностероиды **1: 647**
- Браун Майкл **2: 490, 493**
- Брожение, при пивоварении **2: 94–96; см. также** Ферментация
- Бунгаротоксин **1: 581**
- Бурая жировая ткань **2: 585–588**
- митохондрии **2: 348**
- Буферные системы **1: 96–98**
- Бухнер Эдуард **1: 270; 2: 66, 132**
- Быстро сокращающиеся мышцы **2: 587, 588**
- Бычья губчатая энцефалопатия **1: 217, 218**
- Бьюкенен Джон **2: 544**
- В**
- Вагелос П. Рой **2: 494**
- Вазопрессин **2: 576, 577**
- Вакцины, на основе вирусов **3: 146**
- Валин **1: 118**
- биосинтез **2: 523, 524**
- в гемоглобине S **1: 247**
- катаболизм **2: 288, 294, 296, 297**
- Валиномицин **1: 571**
- Ванадат **1: 560**
- Ван-дер-Ваальса радиус **1: 34, 35**
- Ван-дер-ваальсовы взаимодействия **1: 82, 83**
- Вант-Гоффа уравнение **1: 85**
- Варбург Отто **2: 60, 66, 80–83**
- Варбурга эффект **2: 80**
- Вармус Харольд **3: 146**
- Варфарин **1: 512**
- Везикулы **1: 529**
- Вейн Джон **1: 508**
- Векторные реакции, в окислительном фосфорилировании **2: 315, 323**
- Векторы, см. Клонирование векторов
- Вентер Дж. Крэйг **1: 458**
- Вернике–Корсакова синдром **2: 112**
- Вёзе Карл **1: 19, 156; 3: 152**
- Виагра (силденафил) **1: 628**
- Видимый свет
 - поглощение фотопигментами **2: 361–365**
 - электромагнитное излучение **2: 359, 360**
- Виментин **1: 259**
- Винтовая (спиральная) симметрия **1: 207**
- Виокс **2: 462, 463**
- Вирусная инфекция
 - вакцины **3: 146**
 - и онкогены **1: 666**
 - и рак **3: 146**
 - проникновение в клетку **1: 374**
- Вирусные векторы **1: 473, 474**
- Вирусоид **3: 139, 142**
- Вирусы, см. также ВИЧ; Ретровирусы
 - в генной терапии **1: 475, 476**
 - геном **3: 145**
 - ДНК **3: 9**
 - ДНК-полимераза **3: 66**

- и лектины **1: 374**
- и селектины **1: 374**
- капсид **1: 207**
- простого герпеса, ДНК-полимеразы **3: 66**
- РНК **3: 151**
- саркома Рауса **3: 146**
- Витамины **1: 510–512**
- А (ретинол) **1: 511, 652**
- В₁₂ (кобаламин) **2: 240–242**
- С **1: 189–191**
- D **2: 575**
- D₂ (эргокальциферол) **1: 511**
- D₃ (холекальциферол) **1: 510, 511**
- Е (токоферол) **1: 512**
- К **1: 512**
- К₁ (Филлохинон) **1: 512**
- К₂ (менахинон) **1: 512**
- изопреноиды **1: 512, 513**
- биосинтез **2: 497**
- ниацин **2: 51, 53**
- ВИЧ (вирус иммунодефицита человека)
- как пример ретровируса **1: 317; 3: 146, 147**
- лечение **1: 307, 318; 3: 147**
- Вкус, сигнальные механизмы **1: 656, 657**
- Внеклеточный матрикс
- гликозаминогликаны **1: 359, 360**
- протеогликины **1: 363, 364**
- Внутренняя адаптерная последовательность **3: 139**
- Внутренние петли, РНК **1: 409, 410**
- Внутренний фактор **2: 242**
- Вода **1: 73–79**
- мембранный транспорт **1: 556, 571–573**
- расщепление **2: 379–381**
- Водные растворы, *см. также* Вода
- рН **1: 88–91**
- амфифильные соединения **1: 78, 81, 496**
- буферные системы **1: 97, 98**
- гипертонические **1: 86**
- гипотонические **1: 86**
- изотонические **1: 85–87**
- коллигативные свойства **1: 84**
- осмолярность **1: 85**
- слабые кислоты и основания **1: 94–96**
- Водород, перенос гемоглобином **1: 242, 244**
- Водородные связи **1: 75**
- в белках **1: 173, 174, 178**
- в воде **1: 73–75**
- в нуклеиновых кислотах **1: 52, 399, 402, 406**
- в полисахаридах **1: 353, 355, 358**
- типы в биологических системах **1: 76**
- Водоросли, гетерополисахариды клеточной стенки **1: 359**
- Возбужденное состояние молекулы **2: 360**
- Волосы
- α-кератин **1: 177, 185, 186**
- химическая завивка **1: 187**
- Воск **1: 493, 495**
- пчелиный **1: 495**
- Восстанавливающие концы **1: 347, 354**
- Восстанавливающие сахара **1: 347**
- Восстановительный пентозофосфатный путь **2: 112, 406**
- Восстановительный потенциал **2: 311**
- стандартный **2: 47, 48, 312, 322**
- Восстановительный эквивалент **2: 46, 309**
- Вращательная (поворотная) симметрия **1: 207**
- Вращательный катализ **2: 306, 336, 337**
- Врожденная ночная слепота **1: 581**
- Врожденная параамиотония **1: 579, 581**
- Врожденные дефекты метаболизма **1: 505**
- Врожденный миастический синдром **1: 581**
- Вспомогательные пигменты **2: 361**
- Вторичная структура **1: 141, 177–184, 211**
- коллагена **1: 188**
- мотивы **1: 200**
- супервторичная **1: 200**
- ДНК/РНК **1: 406, 410**
- Вторичный мессенджер (посредник) **1: 427, 595–515, 607, 609, 658**
- в регуляции экспрессии **3: 252, 268**
- нуклеотиды **1: 391, 427, 627**
- Вторичный метаболит **1: 32**
- Вторичный системный амилоидоз **1: 215**
- Вули Д. Уэйн **2: 53**
- Вырожденность генетического кода **3: 171**
- Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) **1: 135**
- Вюрц Шарль-Адольф **1: 273, 286**
- Г**
- Г6ФДГ, *см.* Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа
- Газовая постоянная (R) **1: 47, 85, 634; 2: 47**
- Газожидкостная хроматография (ГЖХ) **1: 516, 517**
- Газы, растворимость **1: 79**
- D-Галактитол **2: 90**
- Галактоза **1: 343, 345, 359, 377**
- окисление **1: 347**
- превращение в глюкозо-1-фосфат **2: 89**
- регуляция метаболизма **3: 263, 264**
- Галактозамин **1: 345**
- Галактоземия **2: 90, 117**
- β-Галактозидаза **1: 441; 3: 234, 235**
- Галактозидпермеаза **3: 234, 235**
- β-Галактозиды, и *lac*-оперон **3: 235**
- Галактокиназа **2: 89, 90**
- Галактолипиды **1: 496, 500, 526**
- Галапагосские выюрки, эволюция **3: 278–280**
- Галофильные бактерии, синтез АТФ **2: 387–389**
- ГАМК (γ-аминомасляная кислота) **2: 272, 539**
- рецепторы **1: 579, 640**
- Ганглиозидоз **1: 505**
- Ганглиозиды **1: 502, 503; 2: 477**
- GD3 **1: 376**
- GM1 **1: 375**
- GM2 **1: 505**
- в болезни Тея-Сакса **1: 505**
- функции **1: 369**
- Гаптены **1: 250**
- Гарден Артур **2: 71**
- Гастдуцин **1: 656**
- Гастрин **2: 264**
- Гашиш **1: 622**
- ГДГТ (глицериндиалкилглицеринтетраэфир) **1: 501**
- Гексадекановая кислота **1: 488**
- Гексозомонофосфатный путь **2: 107, 108; см. также** Пентозофосфатный путь
- Гексозы **1: 340–342**
- производные **1: 345, 346**
- фосфорилированные, в гликолизе **2: 70**
- Гексокиназы **1: 293, 308, 309; 2: 71**
- I **2: 141**
- II **2: 140, 141**
- IV **2: 142, 581, 595**
- изоформы **2: 71, 72, 140**

- ингибиторы, в противоопухолевой терапии **2: 82, 83**
- регуляция **2: 141–143**
- Гель-электрофорез, см. Электрофорез
- Гем **1: 227**
- А **2: 310**
- *b*, в комплексе III **2: 317**
- С **2: 310**
- в синтезе d-аминолевулината **2: 532, 533**
- как источник желчных пигментов **2: 534**
- структура **1: 227, 228**
- Гемагглютенин (белок НА) **1: 374**
- Гемовая группа **1: 205, 206**
- Гемовые кофакторы цитохромов **2: 309, 310, 317**
- Гемоглобин
- А **1: 247**
- R/T-формы **1: 235, 236**
- S **1: 247**
- генетические вариации **1: 264, 265**
- гликированный **1: 348, 349**
- олигомерная структура **1: 130**
- при серповидно-клеточной анемии **1: 246–248**
- связывание кислорода **1: 233, 237**
- эффект Бора **1: 243**
- влияние БФГ **1: 245**
- связывание монооксида углерода **1: 240, 241**
- структура **1: 141, 205, 206**
- субъединицы **1: 83, 233–235**
- транспорт водорода **1: 242, 244**
- транспорт диоксида углерода **1: 242**
- транспорт кислорода **1: 233**
- Гемоцитобласты **1: 233**
- Генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами **1: 581**
- Генерализованный ганглиозидоз **1: 505**
- Генетика **1: 50–52**
- Генетическая карта *E. coli* **3: 44**
- Генетическая рекомбинация **3: 81–89**; см. также Рекомбинация ДНК
- Генетические заболевания
- генная терапия **1: 475, 476**
- нарушение фолдинга **1: 215–218**
- Генетические мутации, см. Мутации
- Генетические нарушения метаболизма аминокислот **2: 287**
- ацил-СоА-дегидрогеназы **2: 245**
- в цикле мочевины **2: 277, 278**
- Генетический код **3: 166–178**
- Генная инженерия **1: 434, 479**;
см. также Клонирование
- Генная терапия **1: 475, 476**
- Геном **1: 60**
- аннотированный **1: 61, 62**
- бактерий **3: 10**
- вирусов **3: 9**
- дрожжей **3: 11**
- картирование **1: 450–452, 458, 459**
- проект «Геном человека» **1: 458, 459**
- ПЦР в анализе **1: 452**
- секвенирование **1: 421, 458, 459**
- синтения **1: 462**
- человека **1: 460**
- эволюция **1: 62**
- эукариот **3: 11**
- Геномика **1: 434, 449**
- сравнительная **1: 62, 452, 467**
- функциональная **1: 62**
- Геномные библиотеки **1: 449–451**
- Гены **3: 8**
- гомологичные **1: 61**
- домашнего хозяйства **3: 230**
- иммуноглобулинов, рекомбинация **3: 96, 97**
- материнские **3: 273**
- ортологичные **1: 61**
- паралогичные **1: 61**
- парного правила **3: 274**
- полярности сегментов **3: 274**
- пробела **3: 273, 276**
- сегментации **3: 273**
- смотрители **1: 670**
- Гепарансульфат **1: 361, 364–367**
- Гепарин **1: 360, 361**
- Гепатоциты **2: 580**
- гранулы гликогена **2: 154, 155**
- каскад адреналина **1: 606**
- метаболизм
- аминокислот **2: 582–584**
- глюкозы **2: 581, 582**
- жирных кислот **2: 584**
- питательных веществ **2: 580–582**
- углеводов **2: 581, 582**
- реутилизация триацилглицеринов **2: 467**
- синтез NADPH **2: 454, 455**
- синтез жирных кислот **2: 455–457**
- Гептозы **1: 341, 370**
- Геранилгеранильная группа **1: 573**
- Геранилпирофосфат, в синтезе холестерина **2: 23, 483, 496, 502**
- Гербициды, устойчивость растений **1: 471–473**
- Герса болезнь **2: 159**
- Гетерозиготы, с геном серповидных эритроцитов **1: 247, 248**
- Гетеролитическое расщепление ковалентной связи **2: 20, 21**
- Гетероплазмия **2: 354**
- Гетерополисахариды **1: 352, 359**;
см. также Полисахариды
- Гетеротропная регуляция **1: 245, 322**
- Гетеротропные ферменты **1: 321, 323**
- Гетеротрофы **1: 20, 58**
- Гетерохроматин **3: 257**
- Гиалуронат **1: 361, 367**
- Гиалуронидаза **1: 361**
- Гиалуроновая кислота **1: 360**
- Гиббс Дж. Уиллард **1: 44**
- Гиббса энергия **2: 13**; см. также Свободная энергия
- Гибридизация, см. ДНК, гибридизация; Клонирование
- Гибридные дуплексы **1: 414, 415**
- Гидрид-ион **2: 21, 183, 193, 308, 309**
- β -Гидрокси- β -метилглутарил-СоА, см. НМГ-СоА
- β -Гидроксиацил-АСР-дегидратаза **2: 448, 452**
- β -Гидроксиацил-СоА (3-гидроксиацил-СоА) **2: 234**
- β -Гидроксиацил-СоА-дегидрогеназа **2: 234**
- β -Гидроксибутират **2: 251, 253**
- в головном мозге **2: 590**
- β -Гидроксибутиратдегидрогеназа **2: 252**
- Гидроксилазы **2: 460**
- 5-Гидроксилизин **1: 120**
- в коллагене **1: 188**
- 5-Гидроксиметилцитидин **1: 395**
- 4-Гидроксипролин **1: 120**
- в коллагене **1: 187, 189, 190**
- 2-Гидроксипропановая кислота, см. Молочная кислота
- Гидролазы **1: 104**
- Гидролиз **1: 104**
- АТФ **2: 29, 35**
- ацетил-СоА **2: 34**
- 1,3-бисфосфоглицерата **2: 32**
- гликозидной связи **2: 86, 87**
- глюкозо-6-фосфата **2: 103**
- дисахаридов **1: 351**
- и фосфоролит **2: 87, 88, 155**
- изменение свободной энергии **2: 16, 33, 34**
- креатинфосфата **2: 33**
- переходное состояние **1: 307**
- сложных эфиров **2: 34**
- тиоэфиров **2: 33, 34**

- фосфоенолпирувата **2: 32**
- фосфорилированных соединений **2: 32, 33**
- Гидропатический индекс, *см.* Индекс гидрофобности
- Гидрофильные соединения **1: 77**
- Гидрофобные взаимодействия **1: 81, 211; см. также Слабые взаимодействия**
- в глобулярных белках **1: 194, 195, 199**
- и стабильность белков **1: 173, 209**
- Гидрофобные соединения **1: 77, 81**
- Гиймен Рожэ **2: 567**
- Гилман Альфред **1: 598, 600**
- Гильберт Вальтер **1: 419, 420**
- Гипераммониемия **2: 278**
- Гипергликемия, секреция инсулина **2: 85, 153**
- Гиперглицинемия некротическая **2: 287**
- Гиперинсулинемия **2: 598**
- Гиперинсулинизма/гипераммониемии синдром **2: 270**
- Гиперкалиемический паралич (врожденная парамиотония) **1: 579, 581**
- Гипертонический раствор **1: 86**
- Гиперфенилаланинемия **2: 291**
- Гиперхолестеринемия наследственная **2: 493–495**
- Гиперхромный эффект **1: 413**
- Гипогликемия **2: 592, 597, 598**
- Гипоксантин **1: 394, 395; 2: 555**
- Гипоксантин-гуанинфосфорибозил-трансфераза **2: 556, 557**
- Гипоксия **1: 245; 2: 69, 81**
- адаптационные реакции **2: 345**
- активные формы кислорода **2: 345**
- гидролиз АТР **2: 344**
- Гипоталамо-гипофизарная система **2: 577**
- Гипоталамус **2: 576–578**
- в регуляции массы тела **2: 606, 607**
- Гипотонический раствор **1: 86**
- Гипофиз, гормоны **2: 576–568**
- Гипохромный эффект **1: 413**
- Гипшурат **2: 278**
- Гирке болезнь **2: 159**
- Гистамин **2: 530, 539, 542**
- Гистидин **1: 98, 119, 120**
- биосинтез **2: 529, 530**
- буферные свойства **1: 98, 127**
- кривая титрования **1: 126**
- превращение в α -кетоглутарат **2: 292, 293**
- Гистидинкиназа **1: 645**
- Гистонацетилтрансферазы **3: 258, 259**
- Гистондеацетилазы **3: 258, 259**
- Гистоны **3: 28, 258, 259**
- Глибурид **2: 597**
- Гливек (иматиниб) **1: 669**
- Гликаны **1: 352–354; см. также Полисахариды**
- Гликированный гемоглобин **1: 349**
- Гликобиология **1: 339–390**
- Гликоген **1: 353; 2: 121**
- биосинтез в бактериях **2: 428**
- болезни накопления **2: 159, 160**
- в мышцах **2: 92, 155**
- в цикле Кори **2: 92, 97**
- гидролиз **1: 325, 326**
- гранулы, в гепатоцитах **2: 154, 155, 164**
- как форма запасаания глюкозы **1: 352–354**
- метаболизм **2: 154–165**
- регуляция **2: 165–173**
- отщепление глюкозы **2: 156**
- расщепление **2: 87, 88, 155–158**
- роль гликогена **2: 163, 164**
- сахаронуклеотиды **2: 158**
- синтез **2: 158, 162**
- регуляция **2: 137, 138**
- трехмерная структура **1: 358**
- Гликогенез **2: 155**
- Гликогенин **2: 163, 164**
- и гранулы гликогена **2: 164**
- Гликогенозы **2: 159**
- Гликогенолиз **2: 155**
- Гликогенсвязывающий белок GM **2: 171**
- Гликогенсинтаза **1: 327; 2: 162, 163, 168**
- α **2: 168**
- β **2: 168**
- киназа (GSK3) **1: 622, 630; 2: 168**
- праймер **2: 163, 164**
- регуляция **2: 168**
- фосфорилирование **1: 168**
- Гликогенфосфорилаза **2: 87, 155, 156, 160, 167**
- регуляция **1: 325, 326; 2: 165, 167**
- Гликозаминогликаны **1: 359–361, 363–365**
- Гликозидазы **1: 379, 515**
- Гликозидная связь **1: 348, 350, 355, 357, 368**
- в нуклеотидах **1: 392, 404**
- гидролиз **1: 311, 313, 416**
- изменение свободной энергии **2: 16**
- Гликозилирование белков **3: 207, 213, 214**
- Гликозилфосфатидинозит (GPI) **1: 530, 536, 537, 545**
- Гликоконъюгаты **1: 339, 363**
- гликолипиды **1: 364, 369**
- гликопротеины **1: 363, 367–369, 3: 207, 213**
- протеогликины **1: 363–367**
- Гликолатный путь **2: 421, 422**
- Гликолиз **2: 66–90, 144, 149**
- в опухолевых тканях **2: 81–83**
- в хлоропластах **2: 430**
- взаимопревращения триозофосфатов **2: 74, 75**
- и глюконеогенез **2: 99, 105**
- согласованная регуляция **2: 139–153**
- роль фруктозо-2,6-бисфосфата **2: 144–146**
- изменение свободной энергии в эритроцитах **2: 98**
- образование АТР **2: 80**
- подготовительная стадия **2: 67, 68, 71–75**
- при пониженном содержании кислорода **2: 92**
- пути, питающие **2: 86–90**
- регуляция **2: 80, 105**
- роль глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы **2: 106, 107**
- стадия выплаты процентов **2: 67, 68, 75–79**
- участие глюкозо-6-фосфата **2: 112, 140**
- Гликолипиды **1: 364, 369, 496; см. также Липиды**
- нейтральные **1: 502, 515**
- синтез **2: 476, 477**
- транспорт **2: 478**
- Гликомика **1: 369**
- Гликопротеины **1: 363, 367–369; 3: 207, 213**
- анализ олигосахаридной составляющей **1: 379, 380**
- мембранные **1: 526, 527**
- связывание с лигандами **1: 373**
- топология **1: 530–532**
- Гликофинголипиды **1: 503, 543**
- Гликофорин **1: 369, 527, 531, 532**
- Глиоксилат **2: 212, 288**
- Глиоксилатный цикл **2: 212–215**
- в растениях **2: 247, 436**
- Глиоксисомы **2: 213, 214, 436**
- β -окисление **2: 246, 247, 249**
- Глипизид **2: 597**
- Глипиканы **1: 364, 365**
- Глифосат, устойчивость растений **1: 472, 473**

- Глицеральдегид **1: 37, 117, 342**
 Глицеральдегид-3-фосфат **1: 281; 2: 58, 75**
 – в гликолизе **2: 67–69, 74, 75, 98**
 – в цикле Кальвина **2: 406, 407, 410–416**
 – окисление до 1,3-бисфосфоглицерата **2: 76**
 – синтез **2: 406, 410–412**
 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа **2: 53, 68, 69, 76**
 – активация светом **2: 418, 419**
 – механизм реакции **2: 77**
 Глицерин **1: 491**
 – в мембранных липидах архей **1: 500, 501**
 – в синтезе триацилглицеринов **2: 465**
 – в триацилглицеринах **1: 491**
 – в фосфолипидах **1: 496, 497**
 – структура **1: 491**
 – хиральность **1: 497**
 Глицерин-3-фосфат **1: 497**
 – в синтезе липидов **2: 465, 477**
 – в синтезе углеводов **2: 436, 437**
 – синтез **2: 468**
 Глицерин-3-фосфатдегидрогеназа **2: 342, 465**
 Глицерин-3-фосфатный челнок **2: 341, 342**
 Глицериндиалкилглицеринтетраэфиры (ГДГТ) **1: 501**
 Глицеринкиназа **2: 465**
 Глицеронеогенез **2: 468, 469; см. также** Метаболизм глюкозы
 Глицерофосфатацилтрансфераза **2: 611**
 Глицерофосфолипиды **1: 497, 498; см. также** Триацилглицерин
 – действие фосфолипаз **1: 504**
 – номенклатура **1: 518, 519**
 – полярные головки **1: 496**
 – присоединение головки **2: 470, 471, 473**
 – синтез **2: 464, 465**
 – транспорт **2: 478**
 Глицин **1: 93, 114, 115, 125, 126, 180; 2: 532, 537**
 – биосинтез **2: 519, 521**
 – буферные свойства **1: 109, 125**
 – в α -спиралях **1: 176–181**
 – в β -поворотках **1: 182, 183**
 – в β -слоях **1: 181, 182**
 – в коллагене **1: 188**
 – в синтезе пуринов **2: 544**
 – в фотосинтезе **2: 326, 423**
 – как предшественник порфиринов **2: 532, 533**
 – кривая титрования **1: 123, 124**
 – расщепление до пирувата **2: 285**
 – рецепторы **1: 579, 639**
 Глициндекарбоксилазный комплекс **2: 421, 423**
 Глицинрасщепляющий фермент (глицинсинтаза) **2: 287, 521**
 Глицинсинтаза **2: 287, 521**
 Глобины **1: 203, 228; см. также** Гемоглобин; Миоглобин
 – структура **1: 198, 228**
 Глобозиды **1: 502, 505**
 Глобулярные белки **1: 185 192–207**
 --- в модели липопротеиновых комплексов **1: 589**
 --- денатурация и фолдинг **1: 208**
 --- методы анализа структуры **1: 196–199**
 --- β -повороты **1: 182**
 Глутамат (глутаминовая кислота) **1: 114; 2: 17, 274, 279, 514**
 – биосинтез **2: 513, 524**
 – в биосинтезе пролина и аргинина **2: 519, 520**
 – в метаболизме азота **2: 263, 264**
 – включение аммония **2: 513**
 – высвобождение аммония **2: 269**
 – как усилитель вкуса **1: 681**
 – катаболизм **2: 292, 293**
 – кривая титрования **1: 126**
 Глутамат- γ -полуальдегид **2: 519–521**
 Глутамат-аспаргатная транспортная система **2: 341**
 L-Глутаматдегидрогеназа **2: 269–271**
 Глутамат-оксалоацетаттрансаминаза (ГОТ) **2: 269**
 Глутамат-пируват-трансаминаза (ГПТ) **2: 269**
 Глутаматсинтаза **2: 513, 514**
 Глутамин **1: 120; 2: 105, 278, 517, 519**
 – биосинтез **2: 513**
 – в метаболизме азота **2: 263, 513**
 – как переносчик аминогрупп **2: 263, 264, 270**
 – катаболизм **2: 274, 292, 293**
 Глутаминаза **2: 270, 271, 513**
 Глутаминамидотрансфераза **2: 517**
 – ингибиторы **2: 589**
 – механизм реакции **2: 549**
 Глутаминсинтаза **2: 35, 270, 272, 513–516**
 – аллостерическая регуляция **1: 329, 330; 2: 514, 515**
 Глутаредоксин **2: 537, 550, 551**
 Глутатион **2: 48, 326, 536, 551**
 – биосинтез **2: 536, 536**
 – защита клетки от окислителей **2: 106–108**
 Глутатионпероксидаза **2: 324, 326, 537**
 Глутатионредуктаза **2: 324, 326**
 Глюкагон
 – в мобилизации жирных кислот **2: 228, 229, 467**
 – в регуляции метаболизма глюкозы **2: 146, 167, 170, 595, 598, 599**
 – в регуляции метаболизма холестерина **2: 491, 492**
 – каскадный механизм **2: 166**
 Глюканотрансфераза **2: 156**
 Глюкогенные аминокислоты **2: 98, 104, 280**
 Глюкоза **1: 26, 343**
 – UDP-глюкоза **2: 16, 89**
 – α -форма **1: 344**
 – β -форма **1: 344**
 – в анализе крови **1: 348, 349**
 – в дисахаридах **1: 350, 351**
 – в целлюлозе **1: 355**
 – запасные формы **1: 353**
 ---- гликоген **1: 353, 354**
 ---- крахмал **1: 353, 354**
 – и *lac*-оперон **3: 235–245**
 – использование в клетке **2: 65**
 – как восстанавливающий сахар **1: 347**
 – катаболизм **2: 581, 582**
 --- в опухольной ткани **2: 81–83**
 – метаболизм, *см. также* Брожение; Гликолиз; Глюконеогенез
 --- в головном мозге **2: 590, 591**
 --- в жировой ткани **2: 585**
 --- в мышцах **2: 587–589**
 --- в печени **2: 581, 582**
 --- в поджелудочной железе **2: 595, 596**
 --- при голодании **2: 598, 599, 601**
 --- при сахарном диабете **2: 601, 603**
 --- функция адреналина **2: 602**
 --- функция глюкагона **2: 598, 599**
 --- функция инсулина **2: 594, 595**
 --- функция кортизола **2: 602**
 – окисление **1: 46, 347**
 --- выход АТФ **2: 201, 202**
 --- в нейронах **2: 590–591**
 --- пентозофосфатный путь **2: 109–111**
 --- в клетках до углекислого газа **2: 49**
 – реакция гексокиназы **1: 308**
 – транспорт **1: 553–556; 2: 581**
 --- симпорт с Na^+ **1: 569, 570**

- уровень в крови **2: 592, 593**
- при диабете **1: 348; 2: 603**
- регуляция **2: 593–604**
- фосфорилирование **2: 18, 19**
- эимеры **1: 343**
- Глюкозамин **1: 346**
- Глюкозилцереброзид **1: 501**
- Глюкозо-1-фосфат **2: 89, 157, 160**
- в гликолизе **2: 165**
- в синтезе крахмала **2: 426–428**
- образование из галактозы **2: 89, 90**
- Глюкозо-6-фосфат **1: 45, 46; 2: 98, 99, 112, 122, 158**
- в гликолизе **2: 112**
- в пентозофосфатном пути **2: 107, 108, 110**
- в печени **2: 99, 161, 598**
- в синтезе гликогена **2: 161–163**
- гидролиз **2: 157**
- превращение в глюкозу **2: 99, 104, 598, 599**
- превращение в фруктозо-6-фосфат **2: 72**
- реакция гексокиназы **1: 308, 309**
- регуляция функции инсулина **2: 595**
- Глюкозо-6-фосфатаза **2: 103, 128, 143**
- в печени **2: 157, 158**
- гидролиз глюкозо-6-фосфата **2: 158**
- Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) **2: 109**
- активация светом **2: 419**
- недостаточность **2: 106**
- Глюкозофосфатизомераза (фосфо-глюкоизомераза) **2: 72, 111**
- Глюкозо-аланиновый цикл **2: 271**
- Глюкозурия **2: 603**
- Глюкокиназа **2: 60, 141, 154, 161**
- дефекты **2: 355**
- кинетические свойства **2: 142, 581**
- регуляция **2: 142, 143**
- Глюкокортикоиды **2: 468, 469, 495, 574, 575**
- синтез **2: 495, 496**
- Глюконат **1: 346**
- Глюконеогенез **2: 97–105**
- в мышцах **2: 588, 589**
- в печени **2: 583, 584, 589**
- в прорастающих семенах **2: 436, 437**
- в хлоропластах **2: 430**
- глюкогенные аминокислоты **2: 104, 280**
- и гликолиз **2: 99, 105**
- согласованная регуляция **2: 139–153**
- роль фруктозо-2,6-бисфосфата **2: 144–146**
- и глиоксилатный цикл **2: 212–215**
- и глицеронеогенез **2: 468, 469**
- и цикл лимонной кислоты **2: 104, 105**
- обходные пути **2: 99–103**
- при голодании **2: 253, 598, 601**
- энергетические затраты **2: 103**
- Глюконолактон **1: 346**
- Глюкопираноза **1: 344**
- Глюкотрол **2: 597**
- Глюкуронат **1: 347, 361**
- Голдбергер Джозеф **2: 53**
- Голдштейн Джозеф **2: 490, 491, 493**
- Головной мозг
- метаболизм **2: 590, 599–601**
- потребление глюкозы **2: 97, 590, 591**
- Голодание
- метаболизм глюкозы **2: 599–601**
- синтез кетонных тел **2: 252, 253**
- Голубой флуоресцентный белок (CFP) **1: 612–615**
- Гольджи комплекс
- лектины **1: 375, 376**
- сортировка белков **3: 214**
- транспортные везикулы, см. Транспортные везикулы
- Гомеобокс **3: 241**
- гены **3: 276**
- Гомеодомен **3: 241**
- Гомеостаз **2: 123**
- Гомеотические гены **3: 276**
- Гомогентизатдиоксигеназа **2: 287, 292**
- Гомозиготы, с геном серповидных эритроцитов **1: 247, 248**
- Гомолитическое расщепление ковалентной связи **2: 20, 21**
- Гомологи **1: 61, 157**
- Гомологическая рекомбинация **3: 81–88**
- Гомоплазмия **2: 354**
- Гомополисахариды **1: 352; см. также** Гликоген; Крахмал; Полисахариды
- Гомоцистинурия **2: 287**
- Гормон роста, у растений **1: 470; см. также** Ауксины
- Гормональная регуляция
- гликогенфосфорилазы **1: 326; 2: 172**
- массы тела **2: 604–614**
- метаболизма жиров **2: 173, 457, 466, 469**
- метаболизма углеводов **2: 144, 173, 228, 593–600**
- транскрипции **1: 643, 644**
- уровня глюкозы **2: 593–600**
- уровня холестерина **2: 491**
- экспрессии генов **3: 263, 267, 268**
- Гормональный каскад **2: 570, 577**
- Гормон-чувствительная липаза **2: 599, 602, 611**
- Гормон-чувствительные элементы (HRE) **1: 643; 3: 267, 268**
- Гормоны **2: 566–618**
- адипокины **2: 605**
- активация триацилглицеринов **2: 228, 229**
- анализ **1: 593; 2: 567–569**
- аутокринные **2: 571**
- в качестве сигнальных молекул **1: 608, 609**
- в пищеварении **2: 264, 265**
- витамин D **2: 575**
- время реакции **2: 571**
- ингибирующее действие **1: 608**
- каскады **2: 570, 577, 578**
- катехоламины **2: 574**
- классификация **2: 571, 572**
- коры надпочечников **1: 509; 2: 496, 576**
- механизм действия **2: 570, 571**
- монооксид азота **2: 576**
- открытие **2: 567–569**
- паракринные **2: 571**
- пептидные **2: 572**
- половые **1: 509; 2: 495**
- растительные **1: 470**
- регуляция высвобождения **2: 576–579**
- рекомбинантные **1: 479**
- ретиноидные **2: 575**
- рецепторы **2: 570**
- связывание лектинов **1: 372**
- синтез в митохондриях **2: 347, 348**
- стероидные **1: 509; 2: 574**
- рецепторы **3: 263, 267, 268**
- синтез **2: 495, 496**
- ткани-мишени **2: 577**
- щитовидной железы **2: 575**
- эйкозаноиды **1: 507; 2: 574**
- эндокринные **2: 571**
- ГОТ (глутамат-оксалоацетат-транс-аминаза) **2: 269**
- Гоше болезнь **1: 505**
- ГПТ (глутамат-пируваттранс-аминаза) **2: 269**
- Градиент концентрации **1: 550, 551, 553, 559, 567**
- в поляризации мембраны **1: 633**
- Граны **2: 358**
- Грелин **2: 607, 613, 614**
- Гринберг Дж. Роберт **2: 544**

- Грипп
– методы лечения **1: 374**
– функция лектинов **1: 374**
Грубый экстракт **1: 132**
Грюнберг-Манаго Марианна **3: 142, 143**
Гуанилат **1: 393; 2: 544**
Гуанилилциклазы **1: 595, 627, 628**
– и зрение **1: 655**
Гуанилин **1: 627**
Гуанин **1: 399**
– дезаминирование **1: 416; 2: 555**
– метилирование **1: 418, 419**
Гуаниновые нуклеотиды, регуляция биосинтеза **2: 547**
Гуанозин **1: 393, 400, 407**
– в сплайсинге **3: 126, 153, 154**
Гуанозиндифосфат, *см.* GDP
Гуанозинмонофосфат, *см.* GMP
Гуанозинтетрафосфат (ppGpp) **1: 427**
Гуанозинтрифосфат, *см.* GTP
Губчатая энцефалопатия **1: 217, 218**
Гүлоза **1: 342**
Гуморальный иммунитет **1: 249**
- Д**
Дабсилхлорид **1: 144**
Дальгарно Линн **3: 196**
Дальтон (Да) **1: 32**
Дальтон Джон **1: 655**
Дальтонизм **1: 655**
Дам Хенрик **1: 512**
Дансилхлорид **1: 144**
Двойная спираль
– в транскрипции **3: 106, 107**
– варианты **1: 403–406**
– ДНК **1: 52, 391, 403, 413**
––– раскручивание **3: 15–18**
– РНК **1: 406, 410, 413**
– суперскрученная **3: 15–18**
Двойной липидный слой **1: 496**
––– диффузия флип-флоп **1: 540**
––– кавеолы **1: 546**
––– латеральная диффузия **1: 540, 541**
––– расположение аминокислотных остатков белков **1: 535**
––– рафты **1: 545**
Двугибридные системы в дрожжах **1: 467, 468**
Двумерная ЯМР-спектроскопия **1: 198, 199**
Двумерный электрофорез **1: 139, 149, 463**
Двухкомпонентная сигнальная система **1: 645–648**
Двухплазмидная система **1: 470, 471**
ДГДГ (дигалактозилдиацилглицерин) **1: 499**
Де Дюв Кристиан **2: 160**
Девсона–Даниелли–Робертсона модель **1: 589**
Дегидрирование **2: 46**
Дегидроаскорбат **1: 191**
Дегидрогеназы **2: 27, 46, 51**
– стереоспецифичность в использовании NAD⁺ и NADP⁺ **2: 51, 52**
Дегидрогидроксилизинонорлейцин **1: 188**
7-Дегидрохолестерин **1: 510; 2: 575**
Деградации по Эдману **1: 145**
Дезаминирование нуклеотидных оснований **1: 416**
––– окислительное **2: 269**
––– трансдезаминирование **2: 270**
Дезокси-D-рибоза **1: 340, 393, 424**
Дезокси-D-рибофураноза **1: 393**
Дезоксиаденилат **1: 393, 394**
Дезоксиаденозилкобаламин **2: 240, 242, 553**
Дезоксиаденозилная группа **2: 240, 242**
Дезоксиаденозин **1: 393, 394**
Дезоксиаденозинмонофосфат (dAMP) **1: 394**
Дезоксигемоглобин **1: 206, 235, 246**
Дезоксигуанилат **1: 393, 394**
Дезоксигуанозин **1: 292, 294**
Дезоксигуанозинмонофосфат (dGMP) **1: 393, 394**
Дезоксинуклеозидтрифосфаты, регуляция рибонуклеотидредуктазы **2: 549–551**
Дезоксирибонуклеотиды **1: 393, 394**
– рибонуклеотиды как предшественники **2: 550**
Дезоксисахара **1: 346**
Дезокситимидилат **1: 393, 394**
Дезокситимидин **1: 393, 394**
Дезокситимидинмонофосфат (dTMP) **1: 393, 394**
Дезоксицитидилат **1: 393, 394**
Дезоксицитидин **1: 393, 394**
Дезоксицитидинмонофосфат (dCMP) **1: 394**
Дейхофф Маргарет **1: 115**
Декарбокслирование аминокислот **2: 538, 539**
– α-кетокислот **2: 22**
– окислительное **2: 182**
– с инициацией свободными радикалами **2: 24, 25**
Дексаметазон **2: 468**
Декстран **1: 354, 357**
Декстроза **1: 339**
Делеция **3: 67, 68, 168**
Денатурирующее картирование **3: 47**
Денатурация
– белков **1: 184, 208–210, 271, 332**
– гибридов ДНК-РНК **1: 414**
– ДНК **1: 413–415**
Дендротоксин **1: 581, 640**
Денитрификация **2: 507–509**
Дерматансульфат **1: 361**
Десатуразы **2: 458, 461**
Десенсибилизация рецепторов **1: 605, 606**
Десмин **1: 259**
Десмозин **1: 122, 123**
Джонсон В. А. **2: 181, 222**
Диабет несахарный **1: 556, 572**
Диабет сахарный
– анализ на сахар **1: 102, 347–349**
––– ацидоз **1: 93, 102**
––– взрослого типа у молодых (MODY) **2: 152, 153, 355**
––– диагностика **1: 348; 2: 604**
––– кетоз/кетацидоз **2: 84, 85, 254, 603, 604**
––– лечение **2: 469, 568, 597, 617**
–––– инсулином **2: 568, 569**
–––– производными сульфонилмочевины **2: 597**
––– метаболизм жиров **2: 84**
––– метаболизм углеводов **2: 84**
––– митохондриальные мутации **2: 355, 356**
––– нарушение синтеза жирных кислот **2: 466**
––– нарушение транспорта глюкозы и воды **1: 556**
––– патофизиология **2: 598, 601, 603**
––– редкие формы **2: 153**
––– связь с ожирением **2: 604**
––– теория «липидной нагрузки» **2: 616**
––– тип **1: 2: 603**
––– тип **2: 2: 603, 615, 616**
Диализ, для очистки белков **1: 132, 165, 168**
Диастереомеры **1: 36**
Диацилглицерин **1: 498, 507, 610, 611**
– в синтезе триацилглицеринов **2: 471**
Диацилглицерин-3-фосфат, в синтезе триацилглицеринов **2: 465**
Дигалактозилдиацилглицериды (ДГДГ) **1: 499**
Дигидробиоптеринредуктаза **2: 292**
Дигидроксиацетон **1: 340, 341**

- Дигидроксиацетонфосфат
– в гликолизе **2: 67, 68**
– в глицеронеогенезе **2: 468**
– в цикле Кальвина **2: 415–417**
– обмен на неорганический фосфат **2: 417, 418**
- 1, 25-Дигидроксиголекальциферол**
1: 510, 511; 2: 572, 575
- Дигидролипоилдегидрогеназа **2: 184**;
см. также Пируватдегидрогеназный комплекс
- Дигидролипоилтрансасетилаза **2: 184**; *см. также* Пируватдегидрогеназный комплекс
- Дигидрофолатредуктаза **2: 554, 558–560**
– связывание субстрата **1: 278**
- Дигидрофосфат, буферные свойства **1: 96**
- Дидезоксиинозин (DDI) **3: 147**
- Дидезокси-метод секвенирования ДНК (метод Сенгера) **1: 420**
- Дикого типа клетки **1: 54**
- Димерные хромосомы, репарация **3: 93, 94**
- Диметилаллилпирофосфат, в синтезе холестерина **2: 482**
- Диметилнитрозамин, как мутаген **1: 418**
- Динамическое стационарное состояние **1: 40**
- Динцис Говард **3: 195**
- Динциса эксперимент **3: 195**
- Динеины **1: 257**
- Динитрогеназа **2: 511, 512**
– редуктаза **2: 511, 512**
- Диоксигеназы **2: 459**
- Диоксид углерода
--- ассимиляция **2: 404–417**
--- в C₂-растениях **2: 423**
--- в C₄-растениях **2: 423–425**
--- в САМ-растениях **2: 426**
--- в окислении
---- глюкозы **2: 49**
---- α-кетоглутарата **2: 194**
---- пирувата **2: 183**
---- цитрата **2: 192**
--- в фотосинтезе, *см.* Цикл Кальвина
--- влияние на связывание гемоглобина с кислородом **1: 243, 244**
--- круговорот **2: 6**
--- парциальное давление **1: 100, 101**
--- перенос гемоглобином **1: 242, 243**
--- растворимость в воде **1: 79**
- Дисахариды **1: 339, 340, 348, 351**
– в составе гликозаминогликанов **1: 359, 360**
– восстанавливающие **1: 350**
– гидролиз до моносахаридов **1: 86, 88**
- Дистальный гистидин **1: 232**
- Дисульфидные связи, при секвенировании белка **1: 143–145**
- Дифтерии токсин **3: 209**
- Дифференцировка клеток **2: 124**
- Диффузионный предел **1: 292**
--- растворенных веществ и размеры клетки **1: 18**
- Диффузия
– мембранных липидов **1: 540–543**
– облегченная **1: 552–554, 556**; *см. также* Переносчики
– простая **1: 551**
– скачкообразная **1: 543**
– флип-флоп **1: 540**
- Дихроматы **1: 655**
- Диэлектрическая проницаемость **1: 77**
- ДНК
– А-форма **1: 404**
– В-форма **1: 404; 3: 17**
– G-тетраплекс **1: 407**
– Z-форма **1: 404**
– амплификация, методом ПЦР **1: 452, 453**
– бактериальная **3: 10, 11**
– библиотеки **1: 449–452**
– большая и малая бороздки **1: 401**
– в хлоропластах **3: 12**
– в эукариотах **3: 11–15**
– вирусная **3: 9**
– гибридизация **1: 443, 463, 465**
--- в клонировании **1: 451**
--- в создании библиотек **1: 451**
– гибриды **1: 414, 415**
– гликозилазы, в репарации **3: 68, 71, 72**
– двойная спираль **1: 400**
– двухцепочечные разрывы **3: 77, 84, 90, 97**
– денатурационное картирование **3: 47, 92, 168**
– денатурация **1: 413, 414**
– дрожжевая **3: 11**
– зонды **1: 443, 444, 454, 455**
– и гистоны **3: 257, 258**
– клонирование **1: 434–443**
– кольцевая **3: 17, 44–48**
– комплементарная, *см.* Комплементарная ДНК
– комплементарность нитей **1: 402**
– линкерная, в нуклеосомах **3: 258**
– матричная цепь **3: 108**
– метилирование **1: 419; 3: 58, 68, 69**
– микроинъекции **1: 473**
– митохондриальная **2: 351–354; 3: 171–173**
– мусорная **3: 156**
– мутации **1: 415; 3: 67**
– нематричная (кодирующая) цепь **3: 108**
– нуклеосомы **3: 258**
– нуклеотидный состав **1: 394, 395**
– однонуклеотидный полиморфизм (SNP) **1: 460**
– отжиг **1: 413**
– палиндром **1: 404**
– плазмиды **1: 439**
– повреждение **3: 66, 67**
– повторы **3: 56, 58, 94, 118, 145, 148, 178**
--- инвертированные **1: 404**
--- короткие тандемные (STS) **1: 455, 456**
– порядок зацепления **3: 18**
– регуляторные последовательности **3: 8**
– рекомбинантная **1: 434**
--- применение в медицине **1: 479**
– релаксированная **3: 16**
– рестрикция **1: 434–438**
--- липкие концы **1: 436**
--- тупые концы **1: 438**
– сателлитная **3: 13**
– сверхспирализация **3: 15–17**
--- и топоизомеразы **3: 20**
--- плектонемическая **3: 24**
--- плотность **3: 19, 20**
--- причины **3: 15–17**
--- раскручивание **3: 15–17**
--- соленоидная **3: 25**
--- секвенирование **1: 419–422, 458, 459**
– синтез, *см.* Репликация ДНК
– спаривание оснований **1: 399**
– температура плавления **1: 403**
– типирование **1: 454**
– топоизомеры **3: 20**
– топология **3: 18**
– транспозиция **3: 81, 94**
– транспозоны **3: 94**
– трехцепочечная **1: 405**
– упаковка **3: 16**
– фингерпринтинг **1: 454**
– фосфодиэфирные связи **1: 396**
– химический синтез **1: 422–424**
– Чаргаффа правило **1: 400, 401**
– человеческая **3: 11–15**
– шпильки **1: 405**
– элементы DUE **3: 56, 57**
ДНКазы **3: 48**

- ДНК-хеликаза II, в репарации **3: 68, 70, 74**
- ДНК-гираза **3: 57, 61**
- ДНК-зависимая РНК-полимераза **3: 108, 109, 121**
- ДНК-зависимая транскрипция **3: 106–122; см. также** Транскрипция ДНК
- ДНК-лигазы **1: 434, 435; 3: 48, 55, 62**
– в ник-трансляции **3: 53**
– в репарации **3: 68, 72–74**
- ДНК-маркирующий сайт (STS) **1: 450**
- ДНК-микрочипы (ДНК-чипы) **1: 463–465**
- ДНК-полимеразы **1: 272, 420, 435; 3: 52**
– I **3: 49, 52**
– в ник-трансляции **3: 53**
– открытие **3: 49**
– фрагмент Клёнова **3: 53**
– II **3: 52**
– III **3: 52–55**
– в репарации **3: 68**
– субъединицы **3: 54, 55**
– IV **3: 79**
– V **3: 78**
– α , δ **3: 64, 65**
– ϵ **3: 65**
– η , β , ι и λ **3: 79**
– в ник-трансляции **3: 53**
– в репликации
– бактерий **3: 56–62**
– эукариот **3: 64–66**
– вирусная **3: 66**
– коррекция ошибок **3: 52**
– матрица **3: 45**
– процессивность **3: 50**
– РНК-зависимая **3: 144**
– 3'→5'-экзонуклеазная активность **3: 51, 52**
– 5'→3'-экзонуклеазная активность **3: 52, 53**
- ДНК-праймазы **3: 55, 58–60**
- ДНК-репликативная система (реплисома) **3: 54**
- ДНК-связывающие белки **3: 54, 58, 111**
- ДНК-связывающий домен/мотив **3: 237–241**
- ДНК-фотолиазы **3: 68, 74, 80**
- Добжанский Феодосий **1: 54**
- Додекановая кислота **1: 488**
- Додecilсульфат натрия (SDS) **1: 136, 529**
- Дойси Эдвард **1: 512**
- Долихол **1: 513, 514, 518**
- Домен (группа организмов) **1: 18, 19**
- Домен (надмолекулярная структура) **1: 154, 200, 201**
– смерти **1: 672, 673**
- Доминантная тугоухость **1: 581**
- Доноры водорода, в фотосинтезе **2: 386**
- Дофамин **2: 538, 539**
- Дочерние хромосомы **1: 403, 660**
- Дрожжи
– двугибридная система **1: 467, 468**
– искусственные хромосомы **1: 442, 443**
– переклочение типов спаривания **3: 256**
– регуляция метаболизма галактозы **3: 263, 264**
– репликация **3: 64**
– РНК-полимераза II **3: 118**
– секвенирование генома **1: 459**
– тРНК аланина **3: 184, 185**
– тРНК фенилаланина **1: 411; 3: 186**
– факторы спаривания **1: 658**
– ферментация **2: 66, 67, 69**
– хромосомы **3: 11, 14**
– центромеры **3: 14**
- Дыхательная цепь (цепь переноса электронов) **2: 182, 306–326**
- E**
- Еноил-АСР-редуктаза **2: 448, 452**
- Еноил-СоА-гидратаза **2: 234, 235, 248**
- Еноил-СоА-изомераза **2: 238, 239, 248**
- Енолаза **2: 79, 128**
– каталитическая активность **1: 309, 310**
- Ж**
- Жакоб Франсуа **1: 15, 408; 3: 234**
- Жасмонат **1: 647**
- Жгутики **1: 656, 657**
– движение **1: 257, 645, 648, 649**
- Железо
– в протопорфирине IX **1: 227, 228; 2: 310**
– гемовое **1: 194, 195, 227, 228; см. также** Гем
– гомеостаз **2: 193**
– двухвалентное, окисление **2: 44, 46, 48**
– железо-чувствительные элементы (IRE) **2: 194**
– потребность организма **1: 29**
– регуляторные белки (IRP) **2: 193, 194**
- Железосерные белки **2: 309, 310**
– Риске **2: 310**
- Железосерные кластеры **2: 192, 311**
– в аконитазе **2: 192, 193**
– реакции **2: 370, 371**
- Желтый флуоресцентный белок (YFP) **1: 612–615**
- Желудочно-кишечный тракт **2: 264**
- Желчные кислоты **1: 504, 519; 2: 484, 494**
- Желчные пигменты, как продукт распада гема **2: 535**
- Жеттен Майк **2: 508**
- Жидко-мозаичная модель мембраны **1: 528, 589**
- Жизнь, происхождение **1: 56, 57, 156; 3: 172; см. также** Эволюция
- Жирные кислоты **1: 487–519; см. также** Липиды
– активация и транспорт **1: 580; 2: 38, 226–23**
– амфифильная природа **1: 80**
– анализ **1: 515–518**
– в бактериальных липополисахаридах **1: 370**
– в восках **1: 495**
– в глицерофосфолипидах **1: 496–498; 2: 464**
– в клетках *E. coli* **1: 539**
– в пищевых жирах **1: 494**
– в триацилглицеринах **1: 491, 492; 2: 464**
– активация **2: 229**
– двойные связи **1: 489**
– десатурация **2: 458–461**
– как липидные якоря **1: 536, 545**
– метаболизм
– в головном мозге **2: 590**
– в жировой ткани **2: 468, 585, 586**
– в мышцах **2: 587, 588**
– в печени **2: 584**
– координированная регуляция синтеза и распада **2: 244**
– при диабете **1: 102; 2: 84, 85**
– роль АМР-зависимой протеинкиназы **2: 131**
– роль инсулина **2: 150**
– у позвоночных в сравнении с другими организмами **2: 105, 211**
– мобилизация **2: 467, 599, 602**
– незаменимые **2: 459**
– номенклатура **1: 488**
– окисление **2: 225–250**
– α **2: 250**
– β **2: 225, 233–236**
– в пероксисомах **2: 245, 246**
– ферменты из разных органелл **2: 247, 248**
– полное **2: 232, 233**

--- ω -, в эндоплазматическом ретикулуле **2: 249**
 --- ненасыщенных жирных кислот **2: 237–239**
 --- с четным числом атомов углерода **2: 239**
 --- регуляция **2: 241–244**
 --- омега-3 **1: 489**
 --- омега-6 **1: 489**
 --- переэтерификация **1: 517; 2: 230**
 --- полиненасыщенные **1: 489**
 --- превращение в ацил-СоА-производные **2: 230, 231**
 --- свободные **1: 490; 2: 229**
 --- синтез **2: 445–464**
 --- в хлоропластах растений **2: 453, 454**
 ---- десатурация **2: 458, 461**
 ---- длинноцепочечных насыщенных жирных кислот **2: 457**
 ---- регуляция **2: 244, 455–457**
 ---- синтаза жирных кислот **2: 447–453**
 ---- система элонгации **2: 457**
 ---- эйкозаноидов **2: 461–463**
 --- температура плавления **1: 490**
 --- *транс* **1: 489, 492, 494**
 --- упаковка **1: 490**
 Жировые клетки, *см.* Адипоциты
 Жиры; *см. также* Жировая ткань;
 Триацилглицериды
 – прогорклые **1: 493**
 – производство тепла **2: 236, 585**

3

Закман Берт **1: 575**
 Закон действующих масс **2: 17, 77, 128**
 --- для определения энергетического состояния клетки **2: 344**
 Закрытая система **1: 41**
 Заменяемые аминокислоты **2: 278;**
см. также Аминокислоты
 Заместительная мутация **3: 67**
 Замечник Пол **1: 10; 3: 166**
 Занамивир (реленза) **1: 374**
 Запасные липиды **1: 487–495**
 Запасные полисахариды **1: 353**
 Запахи, пути передачи **1: 650–656**
 Заряд аминокислоты **1: 120, 125**
 Звездчатые эндотелиоциты **2: 580**
 Зеленый флуоресцентный белок (GFP) **1: 451, 478, 609, 612, 613–615**
 Зеркальный повтор, в ДНК **1: 406**
 Зимоген **1: 328**
 Змеиный яд **1: 522, 581**

Зокор (симвастатин) **2: 494**
 Зонды
 – флуоресцентные **1: 421, 541, 542, 609**
 – ДНК/РНК **1: 443, 444, 454, 455**
 Зрение **1: 650–656**

И

Ибупрофен **2: 462**
 Ивата Соу **1: 568**
 Иглобрюх, яд **1: 579**
 Иди–Хофсти уравнение **1: 335**
 Излучение электромагнитное **2: 359, 360**
 --- повреждение ДНК **1: 417, 418**
 --- поглощение ДНК **1: 413**
 Изменение биохимической свободной энергии **1: 274**
 Изолейцин **1: 49, 118**
 – катаболизм **2: 289**
 – превращение в сукцинил-СоА **2: 288, 289, 294**
 – синтез **2: 523, 524, 531**
 Изолированная система **1: 41**
 Изомеразы **2: 87, 109**
 Изомеризация **2: 23, 24**
 Изомеры
 – геометрические **1: 34, 35**
 – конфигурационные **1: 35**
 – стереоизомеры **1: 35, 36, 39**
 Изопентилпирофосфат, в синтезе холестерина **2: 23, 482**
 Изопрен, в синтезе холестерина **2: 480–483**
 Изопреноиды
 – как липидные якоря **1: 536, 537, 545**
 – синтез **2: 496, 497**
 Изопропильтиогаляктозид (ИПТГ) **3: 236, 285**
 Изопротеренол **1: 67**
 Изоферменты **2: 71, 72**
 Изоцитрат **2: 192, 200, 212**
 Изоцитратдегидрогеназа **2: 192, 193, 210, 214**
 Изоцитратлиаза **2: 212**
 Изоэлектрическая точка (pI) **1: 125, 126, 137**
 Изоэлектрофокусирование **1: 137–139**
 Икосаэдрическая симметрия **1: 207**
 Имагиниб (глибек) **1: 669**
 Иммунизация вирусными вакцинами **3: 14**
 Иммунитет
 – гуморальный **1: 249**
 – клеточный **1: 249**

Иммунная система **1: 249**
 --- интегрины **1: 642**
 --- клетки **1: 249, 250**
 --- клональная селекция **1: 250, 256**
 --- коррекция дефектов методами генной терапии **1: 475–477**
 --- селектины **1: 373, 374**
 --- у растений/животных **1: 648, 649**
 --- эволюция **3: 97, 98**
 Иммуноблоттинг **1: 256**
 Иммуноглобулиновая складчатость **1: 252**
 Иммуноглобулиноподобные белки **1: 549**
 Иммуноглобулины (Ig) **1: 249, 251;**
см. также Антитела
 – А **1: 252**
 – D **1: 252**
 – E **1: 252, 253**
 – G **1: 252–254**
 – M **1: 252**
 – рекомбинация **3: 96, 97**
 Иммунодефициты
 – лечение **3: 147**
 – генная терапия **1: 475–477**
 Иммунопреципитация, для выделения белков **1: 467**
 Иммуноферментный анализ, *см.* ИФА
 Импортин **3: 216, 217**
 Инактивация генов, метод анализа **1: 461**
 Инвертированные повторы ДНК **1: 405, 406**
 Ингибирование
 – кинетические методы анализа **1: 296**
 – кооперативное **2: 529, 531**
 – последовательное с отрицательной обратной связью **2: 532**
 Ингибиторный G-белок (Gi) **1: 608**
 Ингибиторы
 – бесконкурентные **1: 295–298**
 – в медицине **1: 314–318**
 – действующие по принципу обратной связи **1: 49, 321**
 – кинетические методы определения типа **1: 296**
 – конкурентные **1: 295–298**
 – неконкурентные **1: 297**
 – необратимые **1: 298**
 – обратимые **1: 295**
 – смешанные **1: 295–298**
 – суицидные **1: 298**
 Индекс гидрофобности **1: 116, 534**
 Индирубин **1: 669**
 Индолилacetат (ауксин) **1: 470, 647**

- Индольное кольцо, в триптофане
1: 118, 119, 377
- Индукторы 3: 235, 236
- Индукция 3: 230, 235, 236
- Индубибельные гены 3: 230
- Индущированное соответствие 1: 282
— модель 1: 243
— при связывании антигена с анти-
телом 1: 252
— при связывании фермента с суб-
стратом 1: 278
- Индущируемый гипоксией фактор
HIF-1 2: 81, 211, 345, 346
- Инициаторная последовательность
(Inr) 3: 117
- Инициаторный (стартовый) кодон
3: 170, 199
- Инициаторный комплекс
— бактерий 3: 196, 198
— эукариот 3: 198, 199
- Инициация трансляции 3: 195–198
- Инман Росс 3: 47
- Инозин 1: 395; 3: 176
- Инозинат (IMP) 2: 545–547
— в антикодонах 3: 174, 185
- Инозит, в синтезе липидов 2: 474
- Инозит-1,4,5-трифосфат (IP₃) 1: 507,
610, 611
- Инсерционные мутации 3: 67
- Инсерционные последовательности
(IS) 3: 94
- Инсулин 1: 143; 2: 572
— аминокислотная последователь-
ность 1: 143, 168, 169
— в метаболизме
---- жиров 2: 244
---- углеводов 2: 84, 137, 146, 170
---- холестерина 2: 84, 492
— в регуляции массы тела 2: 607–614
— в сигнальных путях 1: 619–622,
624, 625
— в синтезе
---- гликогена 2: 137, 168, 170, 171
---- триацилглицеринов 2: 466
— как пептидный гормон 2: 572
— нечувствительность 2: 469, 612,
615
— открытие 2: 568, 569
— отсутствие при нарушении окис-
лительного фосфорилирования
2: 356
— при диабете 2: 348, 349, 556; 2: 84,
85, 153, 603
— регуляция уровня глюкозы 1: 556,
557; 2: 85, 593–596
— регуляция экспрессии 1: 621; 2: 149
— рецептор 1: 170, 619, 624, 626
— субстрат-1 1: 619
— тирозинкиназная активность
1: 619, 620, 624
— сигнальная последовательность
2: 572
— синтез 2: 572, 573
- Инсулиннезависимый сахарный диа-
бет 2: 612, 615
- Инсулинозависимый сахарный диа-
бет, см. Сахарный диабет I типа
- Интеграза 1: 317, 474; 3: 91–93, 145
- Интегральные мембранные белки
1: 531–533
- Интегрины 1: 367, 549, 641, 642
- Интермедиат (промежуточное со-
единение) 1: 275
- Интерференция РНК 3: 270
- Интроны 3: 12, 122, 123
— сплайсинг 3: 125–129, 131, 133, 139,
140, 148
- Инфаркт миокарда 1: 140, 141
- Информационная РНК, см. мРНК
- Информационные макромолекулы
1: 33, 391
— сахара 1: 363, 371
- Ион гидроксония 1: 89
- Ионизация
— аминокислот 1: 119, 124
— воды 1: 89
— зависимость от pH 1: 96
— кислот 1: 98
— константа равновесия 1: 89, 94
— пептидов 1: 128, 299
- Ионизирующая радиация, поврежде-
ние ДНК 1: 417, 418
- Ионная помпа, см. АТРазаы; Пере-
носчики
- Ионное произведение воды (K_w)
1: 91
- Ионные взаимодействия 1: 77, 78; см.
также Слабые взаимодействия
— и стабильность белков 1: 96, 173,
174, 235, 236
- Ионные каналы 1: 553, 573, 595, 633
— α -спирального типа 1: 638
— Ca²⁺ 1: 561, 611, 618, 635
— дефекты 1: 581
— Cl⁻ 1: 633–635, 639
— при кистозном фиброзе 1: 565,
566
— K⁺ 1: 536, 575–578; см. также
Калиевые каналы
— дефекты 1: 581
— в сигнальных путях 1: 635
— Na⁺ 1: 635
— дефекты 1: 579, 581
— в сигнальных путях 1: 635, 637
- анализ функции 1: 574
— ацетилхолиновый рецептор 1: 638
— в нейронах 1: 639
— действие токсинов 1: 579, 602
— лигандзависимые 1: 574, 579, 636
— отличие от переносчиков 1: 574
— потенциалзависимые 1: 574, 578,
579, 636
- Ионообменная хроматография
1: 132, 133
- Ионофоры 1: 550, 570
- Ионы водорода, концентрация 1: 89,
96; см. также pH
— градиент 1: 567
— как внутриклеточные мессендже-
ры 1: 633
— концентрация в цитозоле/внекле-
точной жидкости 1: 634, 635
— содержание в крови 2: 591, 592
- Иринотекан 3: 25
- Искусственные хромосомы 1: 439,
442, 443; 3: 15
— бактериальные 1: 439, 442
— дрожжевые 1: 442, 443; 3: 15
— человеческие 3: 15
- ИФА (ELISA) 1: 255, 256; 2: 570
- Ишемия, гидролиз АТФ 2: 344, 345
- ## К
- Кавеолин 1: 545, 546, 632
- Кавеолы 1: 545, 546, 609, 632
- Казеинкиназа II 2: 168
- Кайзер Дейл 1: 438
- Калиевые каналы 1: 575–578, 635
— АТФ-зависимые 2: 597
— в метаболизме глюкозы 2: 595,
596
— дефекты 1: 581
— структура 1: 575–578
- Калий
— концентрация в клетке 1: 634
— транспорт с помощью Na⁺/K⁺-
АТРазаы 1: 562
— уровень в крови 2: 591, 592
- Калнексин 1: 376
- Кальвин Мелвин 2: 403–406
- Кальвина цикл 2: 404, 407
— реакции фиксации углерода
2: 406 407
— рубиско 2: 407–413
— стехиометрия 2: 415
— участие АТФ 2: 415
— участие NADPH 2: 415
- Кальмодулин 1: 614–616
- Кальретикулин 1: 376

- Кальций
– в зрительной функции **1: 651, 659**
– в мышечном сокращении **1: 261**
– регуляция **2: 576**
– содержание в крови **2: 592**
- Кальцитонин
– альтернативный процессинг гена **3: 131, 132**
- Кальцитриол **2: 576**
- Каннабиноиды **1: 622**
- Капсид вируса, симметрия **1: 207**
- Карбаминогемоглобин **1: 244**
- Карбамоилглутамат **2: 279**
- Карбамоилфосфат, образование **2: 547, 548**
- Карбамоилфосфатсинтетаза
– I **2: 273, 275, 277, 287, 548**
– недостаточность **2: 279**
– II **2: 548, 549**
- Карбанион **2: 21–23, 95, 111, 198**
- Карбоангидраза **1: 105, 242, 336**
- Карбокатион **2: 21–23**
- Карбоксибиотин **2: 100, 101**
- Карбоксигемоглобин **1: 240**
- γ -Карбоксиглутамат **1: 123**
- Карбоксипептидаза
– A **2: 264**
– B **2: 264**
- Карбонаты, переходное состояние при гидролизе **1: 307**
- Карбонильная группа **2: 22–24**
- Карбоновые кислоты **1: 31, 32; 2: 181**
- Карвон, стереоизомеры **1: 39**
- Кардиолипин **1: 498, 527; 2: 321**
– синтез **2: 472, 474**
- Карнитин **2: 230**
- Карнитинацилтрансфераза I/II **2: 230–232, 610**
- Карнитиновый переносчик **2: 230–232**
- Карнубский воск **1: 495**
- β -Каротин **1: 511, 512, 652; 2: 362**
- Каротиноиды **2: 361**
- Картирование
– *E. coli* **3: 44**
– геномов **1: 451, 458**
– денатурацией **3: 47**
- Карутерс Марвин **1: 423**
- Каспазы, в апоптозе **1: 672, 673; 2: 350**
- Катаболизм **1: 48, 49; 2: 7–9, 69, 581**
– аминокислот **2: 261–272, 280–298**
– белков, жиров и углеводов при клеточном дыхании **2: 181, 182**
– глюкозы, в опухолевых тканях **2: 81–83**
– жирных кислот **2: 226–250**
– пиримидинов **2: 556, 557**
– пуринов **2: 555, 556**
- Каталаза **2: 146, 246, 247**
- Катализ
– в движении липидов через двойной слой **1: 540, 541**
– вращательный **2: 306**
– ионами металла **1: 284**
– кислотнo-основной **1: 283, 284**
– ковалентный **1: 284**
– регуляторные ферменты **1: 319, 320**
– специфичность **1: 281**
- Каталитическая константа (число оборотов) (k_{cat}) **1: 291**
- Каталитическая триада **1: 303**
- Каталитические антитела **1: 250, 307, 308**
- Катенаны **3: 63**
- Катехоламины **2: 358, 359, 574**
- Катионообменная хроматография **1: 132, 133**
- Качающегося банана модель **1: 568**
- Качающиеся пары нуклеотидов **3: 174, 175**
- Капалот, запасные жиры **1: 493**
- Квант **2: 359, 360**
- кДНК (комплементарная ДНК) **1: 451**
– библиотеки **1: 450**
– клонирование **3: 156, 192**
- Келер Георг **1: 254**
- Кендрю Джон **1: 171, 194, 197, 205**
- Кеннеди Юджин **2: 188, 230, 306, 472**
- Кератансульфат **1: 360, 367**
- α -Кератин **1: 177, 178, 185, 186**
- Кернс Джон **3: 46**
- Кетали **1: 343**
- Кетоацидоз, при диабете **2: 84, 85, 604**
- Кетоацидурия (болезнь кленового сиропа) **2: 287**
- β -Кетоацил-АССР-редуктаза **2: 448, 452**
- β -Кетоацил-АССР-синтаза **2: 448, 450**
- β -Кетоацил-СоА **2: 234, 235**
- β -Кетоацил-СоА-трансфераза **1: 425; 2: 253**
- Кетогексозы **1: 343, 344**
- Кетогенные аминокислоты **2: 105, 280, 281**
- α -Кетоглутарат (оксоглутарат) **1: 190, 191; 2: 104, 188, 193, 199, 200**
– в малат-кетоглутаратной транспортной системе **2: 341, 324**
– в метаболизме глюкогенных аминокислот **2: 104, 280, 292, 293**
– образование из изоцитрата **2: 192, 201**
- окисление до сукцинил-СоА **2: 194, 201**
– перенос α -аминогруппы **2: 266**
- α -Кетоглутаратдегидрогеназа **2: 194, 195, 210**
- Кетоз **2: 204, 466, 603**
- Кетозы **1: 341**
– D- и L-изомеры **1: 341**
- Кетокислоты
– α , дегидрогеназный комплекс **2: 296**
– β , декарбоксилирование **2: 22**
- Кетоновые тела **2: 251–253**
– в печени **2: 580, 584**
– образование из аминокислот **2: 280**
– при голодании **2: 598, 601**
– при диабете **2: 253, 254, 466, 603**
– при мышечном сокращении **2: 587–589**
- Кетоны **1: 31, 340, 343; 2: 251**
- Килби Б. А. **1: 302**
- Киназы **2: 26, 197; см. также** Протеинкиназы
– казеинкиназа **2: 168**
– креатинкиназа **2: 41, 141, 588**
– пируваткиназа **2: 79, 128, 148**
– триозокиназа **2: 89**
– фосфоглицераткиназа **2: 77**
– фосфорилазы β **1: 325, 604, 605; 2: 166**
- Кинезины **1: 257**
- Кинетика **1: 47**
– Михаэлиса–Ментен **1: 287, 289, 290; 2: 126, 135, 136**
– стационарная **1: 287, 288**
– предстационарная **1: 294, 302**
– ферментативных реакций **1: 285**
- Кинетопласт **3: 12**
- Кислород
– круговорот **2: 6**
– парциальное давление **1: 232**
– растворимость в воде **1: 79**
– связывание с гемоглобином **1: 235–238**
– транспорт в крови **2: 591, 592**
- Кислородобразующий комплекс **2: 380**
- Кислородсвязывающие белки **1: 228**
- Кислотно-основное титрование **1: 123, 124**
- Кислотно-основной катализ
– общий **1: 283, 284**
– специфический **1: 283, 284**
- Кислотно-основные пары **1: 93, 94**
– как буферные системы **1: 96, 97**

Кислоты

- аминокислоты **1: 116, 125**
- в качестве буферов **1: 97–99**
- константа диссоциации **1: 94–97**
- кривая титрования **1: 95**
- сильные **1: 94–97**
- слабые **1: 94–97**
- Хендерсона–Хассельбалха уравнение **1: 98**

Кислые сахара **1: 346**

Кистозный фиброз

- дефекты ионных каналов **1: 565**
- нарушение фолдинга белка **1: 215, 217**

Клавулановая кислота **1: 316, 317**Кларк А. Р. **1: 337, 338**Кларк Джон **2: 225**Кленового сиропа болезнь **2: 287, 297**Клетки **1: 17**

- бактериальные **1: 20, 21, 33**
- киллеры (цитотоксические Т-клетки) **1: 249, 250**
- Лангерганса **2: 595**
- основные химические компоненты **1: 26, 32**
- поджелудочной железы
- α **2: 595**
- β **2: 568, 573, 595, 596, 603, 617**
- размер **1: 18**
- структура **1: 17, 18**
- эукариотические **1: 22–24**
- Клеточная оболочка **1: 20, 21**
- Клеточная смерть программируемая, см. Апоптоз

Клеточная стенка, синтез полисахаридов **2: 431–433**Клеточное дыхание **2: 181, 182**

- альтернативные пути в растениях **2: 420**

- перенос электронов в митохондриях **2: 327–329**

Клеточный иммунитет **1: 249;**

см. также Иммунная система

Клеточный цикл

- мейоз **3: 82**
- регуляция **1: 664, 665**
- роль циклинзависимых протеинкиназ **1: 664**
- стадии **1: 660**
- хромосомные изменения **3: 27**

Клёнова фрагмент **3: 53**Клод Альбер **1: 24**Клон **1: 254, 434**Клональная селекция **1: 250, 256**Клонирование **1: 434–448**

- белковые тэги для хроматографии **1: 447**

- в бактериях **1: 434–448**
- в животных **1: 473, 475, 479**
- в растениях **1: 469–473**
- векторы, см. Клонирование векторы
- гибридизация **1: 443**
- ДНК-лигазы **1: 434; 3: 55, 62**
- кДНК **1: 450; 3: 156–158**
- линкеры/полилинкеры **1: 438**
- микроинъекция **1: 473**
- мутагенез **1: 446**
- получение большого количества белка **1: 444**
- ПЦР **1: 452, 453**
- рестриктазы **1: 434, 436, 437**
- слитые белки **1: 447**
- трансформация **1: 449, 470, 473, 476, 477**
- ферменты **1: 435**
- флуоресцентных маркеров **1: 612**
- электропорация **1: 439**
- Клонирование векторы **1: 434, 435, 437–440**
 - бактериофаги **1: 441**
 - вирусные **1: 473, 474**
 - для растений **1: 469–472**
 - искусственные бактериальные хромосомы **1: 439, 441, 442**
 - искусственные дрожжевые хромосомы **1: 442, 443**
 - плазмиды **1: 434, 439, 440**
 - Ti **1: 469, 470**
 - ретровирусные **1: 473, 474**
 - фаг λ **1: 441; 3: 92, 93, 285**
 - шаттлы **1: 443**
 - экспрессирующие **1: 444, 445**
- Клубеньки, фиксация азота **2: 510, 512, 513**
- Кляйзена конденсация **2: 22, 23**
- Коагуляция
 - протеолиз **1: 329**
 - роль селектинов **1: 373, 374**
- Коактиваторы **3: 260–262**
- Кобаламин, см. Витамин B₁₂
- Кобротоксин **1: 581, 640**
- Ковалентная связь **1: 27, 29, 75, 82, 114, 172**
 - в соединениях фосфора **2: 35**
 - в ферментативных реакциях **1: 277, 284**
- гетеролитическое расщепление **2: 20, 21**
- гомолитическое расщепление **2: 20, 21**
- Ковалентные модификации регуляторных ферментов **1: 319, 323–328; 2: 127, 515, 516**

Ковалентный катализ **1: 283, 284**Козеины **3: 36**Кодирующая цепь ДНК **3: 108, 109**Кодоны **1: 445, 483; 3: 167–180, 191–204**Коинтеграция **3: 95**Коклюшный токсин **1: 602**Колбочки **1: 650–656**Коллаген **1: 187, 188**

- аминокислотный состав **1: 187**
- и аскорбиновая кислота **1: 189–191**
- и протеогликаны **1: 367**
- нарушения структуры **1: 191, 192**

Коллигативные свойства **1: 84**Коллинз Френсис **1: 457, 458**Коллип Дж. Б. **2: 568**Колоночная хроматография **1: 132, 133**Кольцевая ДНК **3: 44–48**Кольцевые липиды **1: 534**Компактин **2: 494**

Комплекс

- I (NADH/убихинон) **2: 313, 314, 322**
- II (сукцинат/убихинон) **2: 313, 316, 322**
- III (убихинон/цитохром c) **2: 313, 317, 318, 321, 322**
- IV (цитохром c/O₂) **2: 313, 318, 320–322**
- лиганда с рецептором **1: 592–594**
- транслокации **3: 212, 218**
- фермент-субстратный, см. Фермент-субстратный комплекс
- Комплементарная ДНК (кДНК) **1: 451; 3: 146**
 - библиотеки **1: 451; 3: 156–158**
 - для гибридизации **1: 463, 465; 3: 158**

Конденсация **1: 104, 272, 510**

- при образовании пептидной связи **1: 127**

- сложноэфирная (Кляйзена) **2: 22, 23**

– хромосом **3: 36**Конденсины **3: 36**Конкурентный ингибитор **1: 295–298**Консенсусные последовательности **1: 155, 156**— *oriC* **3: 56**— промоторов **3: 231, 232, 244**

- узнаваемые протеинкиназами **1: 325, 327, 603, 615**

Консенсусное древо жизни **1: 19**

Константа

- ассоциации (K_a) **1: 229**

- в анализе по Скэтчгарду **1: 593**

- Больцмана (k) **2: 13**
 - диссоциации комплекса (K_d)
 - антигена с антителом **1: 253**
 - лиганда с рецептором **1: 231, 592, 593**
 - фермента с субстратом **1: 290**
 - кислотной диссоциации (K_a) **1: 93, 94**
 - Михаэлиса (K_M) **1: 288, 290, 291**
 - кажущаяся **1: 295, 296**
 - равновесия (K_{eq}) **1: 276**
 - скорости (k) **1: 229, 276, 277**
 - Конститутивная экспрессия **3: 230**
 - Континги **1: 449, 458**
 - Конфигурация **1: 345**
 - Конформация
 - α **1: 181, 187, 192, 200–202**
 - небольших глобулярных белков **1: 199**
 - ванна **1: 354**
 - и конфигурация **1: 354**
 - кресло **1: 345**
 - нативная **1: 53**
 - Кооперативное ингибирование **2: 530**
 - Кооперативное связывание **1: 237–239, 242–244**
 - Корана Х. Гобинд **1: 423; 3: 170**
 - Кори (Форбса) болезнь **2: 159**
 - Кори Герти **2: 92, 121, 159, 160, 165**
 - Кори Карл **2: 92, 121, 159, 160, 165**
 - Кори Роберт **1: 35, 174, 177, 181, 186**
 - Корнберг Артур **2: 160; 3: 49**
 - Корнберг Ханс **2: 212**
 - Корнфорт Джон **2: 484**
 - Коровьего бешенства болезнь, см. Бычья губчатая энцефалопатия
 - Коронарный тромбоз **1: 512, 628; 2: 493, 495, 590**
 - Корончатый галл **1: 470**
 - Короткие tandemные повторы (STR) **1: 455**
 - Корректирующая активность
 - в репликации **3: 50–52**
 - в транскрипции **3: 110, 146**
 - в трансляции **3: 188, 189**
 - Корриновая кольцевая система **2: 240**
 - Кортизол **1: 509; 2: 468, 576, 578**
 - в метаболизме глюкозы **2: 602, 603**
 - Кортикостероиды **1: 509; 2: 468, 574, 602, см. также Стероидные гормоны**
 - синтез **2: 495**
 - Котранспортные системы **1: 556, 558, 562, 567**
 - Кофакторы
 - ферментов **1: 271**
 - нитрогеназного комплекса **2: 510–512**
 - Коферменты **1: 271; 2: 201, 281**
 - А (CoA) **1: 271, 426; 2: 183, 184**
 - B_{12} **2: 240, 242, 284**
 - NAD^+ и $NADP^+$ **1: 426**
 - стереоспецифичность дегидрогеназ **2: 50**
 - Q (убихинон) **1: 512, 513 2: 309, 314, 322**
 - биотин **2: 100, 101**
 - в пируватдегидрогеназном комплексе **2: 183, 184**
 - как универсальные переносчики электронов **2: 49, 307, 460**
 - липоевая кислота **2: 183**
 - пиридоксальфосфат **2: 266, 267**
 - простетические группы **1: 271**
 - тиаминпирофосфат **2: 94, 95**
 - флавиннуклеотиды **2: 426**
 - Кошланд Даниэль **1: 242, 282**
 - Коэн Стенли **1: 433**
 - Коэффициент
 - специфичности (k_{cat}/K_M) **1: 292**
 - эластичности (ϵ) **2: 134–136**
 - Красные кровяные клетки, см. Эритроциты
 - Красные мышечные волокна **2: 587**
 - синдром МЭРКМВ **2: 355**
 - Крахмал **1: 353–358**
 - биосинтез **2: 426–428**
 - в амилопластах **2: 405, 406**
 - расщепление **2: 86–88**
 - фосфорилаза **2: 87**
 - Крахмалсинтаза **2: 427, 428**
 - Креатин **2: 536, 537**
 - в мышечном сокращении **2: 588, 589**
 - Креатинкиназа **2: 588, 589**
 - Кребс Ханс **2: 83, 181, 182, 222, 223, 261, 273**
 - Кребс Эдвин **2: 160**
 - Кребса бицикл **2: 275, 276**
 - Кребса цикл (цикл трикарбоновых кислот, цикл лимонной кислоты) **2: 181, 182, 188–207**
 - Крейцфельда–Якоба болезнь **1: 217, 218**
 - Крестonosцы **1: 189**
 - Крестообразные структуры, ДНК **1: 406**
 - Крик Френсис **1: 9, 398–403; 3: 45, 50, 152, 167, 174**
 - Криптохромы **2: 55**
 - Кровь
 - рН **1: 92, 93, 102**
 - буферные свойства **1: 98–101**
 - группы, роль сфинголипидов **1: 503**
 - липопротеины **2: 485–488**
 - метаболические функции **2: 591, 592**
 - перенос аммиака **2: 270**
 - перенос кислорода **1: 228–233**
 - плазма **1: 86; 2: 591, 592**
 - содержание глюкозы **1: 553–556; 2: 592**
 - состав **2: 591**
 - транспортные функции **2: 591, 592**
 - электролиты **2: 591**
 - Крокодилы **2: 92**
 - Кроссинговер **3: 83**
 - Круговой дихроизм **1: 590**
 - Кручение (ДНК) **3: 20**
 - Ксантин **1: 395; 2: 555**
 - Ксантиноксидаза **2: 555, 557**
 - Ксенобиотики **2: 349**
 - Ксилоза **1: 108, 364**
 - Ксилулоза **1: 342**
 - Ксилулозо-5-фосфат **2: 81, 82, 109, 111**
 - в регуляции метаболизма углеводов и жиров **2: 146, 150, 151**
 - в цикле Кальвина **2: 412, 413**
 - Кунен Гижс **2: 508**
 - Культура ткани **1: 473**
 - Кунитц Мозес **1: 270**
 - Кэбак Рон **1: 568**
 - 5'-Кэп **3: 123**
 - 5'-Кэп-связывающий комплекс **3: 123, 124**
 - Кюне Фредерик **1: 270**
- ## Л
- Лавуазье Антуан **2: 11, 12**
 - Ладдераны **2: 508, 509**
 - Лазерная десорбционноионизационная масс-спектрометрия (MALDI) **1: 149**
 - Лайнуивера–Берка уравнение **1: 289**
 - Лактальбумин **1: 369**
 - β -Лактамаза **1: 316, 317**
 - β -Лактамные антибиотики, устойчивость бактерий **1: 314–316; 3: 10**
 - Лактат **2: 27, 300, 386**
 - в синтезе глюкозы **2: 102**
 - в сокращении мышц **2: 118, 588, 589**
 - Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) **1: 333, 337; 2: 27, 52, 91**
 - изоформы **2: 140, 141**
 - Лактовегетарианцы **2: 301**
 - Лактоза **1: 348, 351; 2: 86, 88**
 - *lac*-оперон **3: 235–245**
 - непереносимость **2: 88**
 - переносчик (лактопермеаза) **1: 567, 568, 588**

- Лактозилцерамид **1: 501**
 Лактоназа **2: 109**
 Лактоны **1: 346, 347**
 Лактопермеаза **1: 567, 568, 588**
 Ламберта–Бера закон **1: 121**
 Ламеллы **2: 358, 378**
 Ланолин **1: 495**
 Ланостерин **2: 484**
 Латеральная диффузия **1: 540–543**
 Латеральный (горизонтальный) перенос генов **1: 157**
 Лауриновая кислота **1: 488**
 ЛДГ, см. Лактатдегидрогеназа
 Леви тельца **1: 217**
 Левингаль Сайрус **1: 210**
 Леггемоглобин **2: 512, 513**
 Легкие цепи
 --- иммуноглобулина **1: 251; 3: 96**
 --- миозина **1: 257**
 Ледер Филипп **3: 169**
 Лейкотриены **1: 507, 508; 2: 463, 574;**
 см. также Эйкозаноиды
 Лейкоциты **1: 249, 250, 475; 2: 592**
 Лейцин **1: 116, 119; 2: 105, 278, 518**
 – биосинтез **2: 523, 524**
 – катаболизм **2: 280, 281, 288, 296**
 --- нарушения **2: 287, 297**
 Лейциновая молния (застежка) **3: 241, 242**
 Лекарства
 – вклад геномики и протеомики в создание **1: 478–480**
 – метаболизм, роль цитохрома Р-450 **2: 349, 460**
 Лекарственная устойчивость
 --- роль АВС-транспортёров **1: 564–566**
 --- роль плазмид **3: 10**
 Лектины **1: 372–378**
 Лелуар Луис **2: 158, 160**
 Ленинджер Альберт **2: 188, 230, 306**
 Лептин **2: 605, 606, 608–610**
 – рецептор **2: 606**
 Лернер Ричард **1: 308**
 Летсингер Роберт **1: 423**
 Лецитин, см. Фосфатидилхолин
 Лецитин-холестеринацилтрансфераза (LCAT) **2: 489**
 Лёша–Нихена синдром **2: 557**
 Лиазы **2: 197**
 Лигазы **1: 197**
 Лигандзависимые каналы **1: 574–579**
 --- в передаче сигнала **1: 634–640**
 Лиганды **1: 135**
 – в иммунных реакциях **1: 249–254**
 – взаимодействие с рецепторами **1: 592, 593**
 --- количественный анализ **1: 592–594**
 – связывание с белками **1: 225–248**
 --- кооперативное **1: 237–242**
 Лигнин **2: 538**
 Лигноцеровая кислота **1: 488**
 Лидирующая цепь **3: 48**
 Лизин **1: 115–117**
 – биосинтез **2: 518, 523, 524, 531**
 – карбамоилирование **2: 407**
 – катаболизм **2: 280, 288**
 Лизолецитин **2: 489**
 Лизосомы
 – в заместительной терапии **1: 375**
 – мечение белков для доставки **1: 375, 378; 3: 210, 214, 220**
 – ферменты **1: 503, 505**
 Лизофосфолипазы **1: 504**
 Лизоцим **1: 129, 139, 200, 272**
 – каталитическая активность **1: 310–313**
 – структура **1: 311**
 Ликсоза **1: 342**
 Лимфоциты **1: 249, 250**
 – В **1: 249, 250, 252; 2: 592**
 – рекомбинация **3: 97**
 – Т **1: 249, 250**
 – и селектины **1: 373**
 – при иммунодефицитах **2: 556**
 – хоминг **1: 373, 374**
 Линд Джеймс **1: 189**
 Линен Феодор **2: 484**
 Линия М (М-диск) **1: 259**
 Линкер **1: 437, 438**
 Линолеат **2: 458, 459, 461**
 – синтез **2: 459**
 Линолевая кислота **1: 499, 521; 2: 238**
 Линоленат **2: 458, 459, 461**
 Линоленовая кислота **1: 489, 521**
 Липазы **1: 379, 491**
 – гормон-чувствительная **1: 605; 2: 229, 599**
 Липидная гипотеза **2: 493, 494**
 Липидные якоря **1: 536, 537**
 --- и рафты **1: 543, 545**
 Липидный слой, см. Двойной липидный слой
 Липидом **1: 519**
 Липидомика **1: 517**
 Липиды **1: 33, 487, 496–517**, см. также Воски; Гликолипиды; Глицерофосфолипиды; Жирные кислоты; Липополисахариды; Сфинголипиды; Фосфолипиды
 – архей **1: 500**
 – биосинтез
 --- глицеронеогенез **2: 468**
 --- мембранных фосфолипидов **2: 470–476**
 --- плазмалогенов **2: 476, 477**
 --- стероидов в митохондриях **2: 348, 349**
 --- сфинголипидов **2: 476–478**
 --- триацилглицеринов **2: 464–467**
 --- функция инсулина **2: 466**
 --- холестерина, стероидов и изопреноидов **2: 479–484, 497**
 --- регуляция **2: 491–493**
 --- эфиров холестерина **2: 485**
 --- эйкозаноидов **2: 461–463**
 – выделение **1: 515, 516**
 – галактолипиды тилакоидных мембран **1: 499, 500**
 – ганглиозиды **1: 369**
 – гидролиз **1: 517**
 – запасные **1: 487, 496**
 – запасы организма **2: 600**
 – как окислительно-восстановительные кофакторы **1: 512**
 – как пигменты **1: 514**
 – как сигнальные вещества **1: 507–512**
 – кольцевые **1: 533, 534**
 – мембранные **1: 26, 369, 370, 496–506**
 --- болезни накопления **1: 505**
 --- микродомены **1: 543, 545**
 --- рафты **1: 543, 545**
 --- у разных организмов **1: 526, 527**
 – метаболизм
 --- в жировой ткани **2: 228, 229, 468, 585–587**
 --- в печени **2: 584, 585, 594**
 --- внутриклеточная локализация **2: 454**
 --- и ожирение **2: 605–614**
 --- функция адреналина **2: 602**
 --- функция кортизола **2: 602**
 --- функция ксилулозо-5-фосфата **2: 146, 147**
 – методы анализа **1: 515–517**
 – основные категории **1: 519**
 – перемещение через двойной липидный слой **1: 540, 541, 543**
 --- измерение скорости **1: 542**
 – пищевые, всасывание **2: 226, 227**
 – плазмалогены **1: 498, 499**
 – при зимней спячке у животных **2: 236**
 – различные функции **1: 513**
 – разрушение в лизосомах **1: 503**

- расщепление, мобилизация и транспорт **2: 226**
- связывание с мембранными белками **1: 536, 537**
- стерины **1: 504**
- структурные, см. Липиды мембранные
- транспорт **2: 485–489**
- Липкие концы **1: 437, 438**
- Липоапоптоз **2: 616**
- Липоат (липовая кислота) **2: 183–186, 207**
- Липоиллизиновая группа **2: 184, 186, 187**
- Липополисахариды **1: 370, 649**;
см. также Полисахариды
- Липопротеинлипаза **2: 228**
- Липопротеиновых субъединиц модель (модель Бенсона) **1: 589**
- Липопротеины **2: 485–490**
- высокой плотности (ЛПВП) **2: 488–491**
- классификация **2: 486**
- низкой плотности (ЛПНП) **2: 486–491**
- очень низкой плотности (ЛПОНП) **2: 486–491**
- простетические группы **1: 131**
- транспорт **2: 485**
- хиломикроны **2: 227, 228**
- Липосомы **1: 529**
- в клонировании животных **1: 473**
- Литотрофы **1: 20**
- Ли–Фраументи раковый синдром **1: 671**
- Лобан Петер **1: 438**
- Ловастатин (мевакор) **2: 494**
- Лондона (Ван-дер-Ваальса) силы **1: 82**
- ЛПВП, см. Липопротеины высокой плотности
- ЛПНП, см. Липопротеины низкой плотности
- ЛПОНП, см. Липопротеины очень низкой плотности
- Лютеин **2: 361–363**
- Лютеинизирующий гормон **1: 369**
- Люцифер желтый **2: 63**
- Люцифераза, в генетических экспериментах **1: 471, 472**
- Люциферин **2: 39**
- М**
- Магния ионы
 - в комплексе с АТФ **2: 27, 28, 30**
 - в цикле Кальвина **2: 405, 408, 418**
- Мак-Ардря болезнь **2: 159**
- Маккарти Маклин **1: 400**
- Маккинкон Родерик **1: 575**
- Макклиток Барбара **3: 81**
- Маклеод Дж. Дж. Р. **2: 568**
- Маклеод Колин **1: 400**
- Макромолекулы **1: 32**
- информационные **1: 33**
- слабые взаимодействия **1: 82, 83**
- энергия для сборки **2: 40**
- Макрофаги **1: 249, 250**
- Макроциты **2: 284**
- Максам Алам **1: 419, 420**
- Максама–Гильберта метод секвенирования **1: 420**
- Максимальная скорость (V_{\max}) **1: 286, 288, 289**
- Макэлрой Уильям **2: 39**
- Малат **2: 101, 198, 199**
- окисление до оксалоацетата **2: 199**
- транспорт **2: 340, 455, 456**
- Малат- α -кетоглутаратная система **2: 341, 455, 456**
- Малат-аспаратный челнок **2: 340, 341**
- Малатдегидрогеназа **2: 199, 425, 454, 455**
- синтез NADPH **2: 454, 455**
- Малатсинтаза **2: 212**
- Малая бороздка **1: 401**
- Малеиновая кислота (малеат) **1: 34; 2: 199**
- Малик-фермент, см. Малатдегидрогеназа
- Маллис Кэри **1: 10, 452**
- Малонил/ацетил-СоА-АСР-трансфераза **2: 450, 451**
- Малонил-СоА **2: 241, 242, 244, 611**
- в синтезе жирных кислот **2: 447–463**
- синтез **2: 446**
- Малые РНК
 - временные (мвРНК) **3: 270**
 - интерферирующие (миРНК) **3: 270**
 - ядерные (мяРНК) **3: 127, 128, 138, 157**
 - ядрышковые (мякРНК) **3: 135, 136, 157**
- Мальгоза **1: 350, 351**
- Мальгосвязывающий белок **1: 447**
- Мальгопорин **1: 536, 357**
- Малярия, и серповидно-клеточная анемия **1: 248**
- Манноза **1: 343**
- окисление **1: 347**
- Маннозамин **1: 345**
- Маннозо-6-фосфат **1: 375**
- рецептор **1: 378**
- Маннозосвязывающий белок **1: 372**
- Марихуана **1: 622**
- Маршалл Барри **1: 374**
- Масса тела, регуляция **2: 604–614**
- PPAR **2: 612, 613**
- адипонектином **2: 610–617**
- грелином **2: 607, 613, 614**
- инсулином **2: 609–612**
- лептином **2: 605–610**
- термогенином **2: 606, 609**
- теория «липидной нагрузки» **2: 615–617**
- функция гипоталамуса **2: 131, 605–614**
- Масс-спектрометрия **1: 32, 149–151**
- MALDI **1: 149, 381**
- в анализе
 - аминокислотной последовательности **1: 148, 149**
 - липидов **1: 517, 518**
 - сахаров **1: 380, 381**
- тандемная **1: 150, 151**
- электроспрей **1: 149**
- Материнская мРНК **3: 273**
- Материнские гены **3: 273**
- Матричная цепь
 - в репликации ДНК **3: 49**
 - в репликации РНК **3: 144, 154**
 - в транскрипции **3: 108**
- Матричная РНК, см. мРНК
- Маттеи Генрих **3: 167**
- МГДГ (моноголактозилдиацилглицерин) **1: 499**
- Мевакор (ловастатин) **2: 494**
- Мевалонат **2: 494**
- в синтезе холестерина **2: 480, 481**
- Мегалобластная анемия **2: 284**
- Мегалобласты **2: 284**
- Медиатор **3: 261–266**
- Медленно сокращающиеся мышцы **2: 587**
- Медузы, флуоресцентные белки **1: 451**
- Медь, в комплексе IV **2: 320–322**
- Межклеточные взаимодействия/адгезия
 - интегрины **1: 549**
 - кадгеринны **1: 549**
 - лектины **1: 372, 73**
- протеогликаны/олигосахариды **1: 364–370**
- селектины **1: 373, 374, 549**
- Мезельсон Мэтью **3: 46**
- Мезельсона–Сталя эксперимент **3: 46**
- Мезофилл листьев, в C_4 -растениях **2: 424, 425**

- Мейергоф Отто **2: 66, 83**
 Мейоз **3: 82–84**
 Меланокортин **2: 608**
 Меланоцитстимулирующий гормон, см. Меланокортин
 Мембранные белки **1: 363, 364**; см. также Гликопротеины; Протеогликаны
 — амфитропные **1: 530, 531**
 — анализ методом атомно-силовой микроскопии **1: 544**
 — в рафтах **1: 545**
 — гидропатический индекс **1: 534**
 — дефекты, как причина заболеваний **1: 217**
 — интегральные **1: 530–532**
 — связь с липидными кольцами **1: 532**
 — остатки Trp и Tug **1: 535, 536**
 — периферические **1: 530**
 — порины **1: 535**
 — связь с липидными компонентами **1: 536, 537**
 — α -спирали **1: 533–535**
 — β -цилиндр (бочонок) **1: 535, 536**
 Мембранные гликопротеины **1: 369**
 Мембранные липиды **1: 26, 369, 370, 496–506; 2: 470–476**
 — архей **1: 500**
 — биосинтез, см. Липиды, биосинтез
 — болезни накопления **1: 505**
 — ганглиозиды **1: 369**
 — диффузия **1: 540, 541, 543**
 — измерение скорости **1: 542**
 — кольцевые **1: 533, 534**
 — микродомены **1: 543, 545**
 — плазмалогены **1: 497, 499**
 — разрушение в лизосомах **1: 503**
 — растений **1: 500**
 — рафты **1: 543, 545**
 — связывание с мембранными белками **1: 536, 537**
 — стерины **1: 504**
 — сфинголипиды **1: 501–504**
 — тилакоидных мембран **1: 499, 500**
 — у разных организмов **1: 526, 527**
 — фосфолипиды **1: 497**
 — эфирные **1: 499**
 Мембранные липополисахариды **1: 369, 270**
 Мембранные переносчики, в митохондриях **2: 307–321**
 Мембранные рафты **1: 543–546, 632**
 — в передаче сигнала **1: 632**
 Мембранный потенциал (V_m) **1: 551, 559, 562, 574, 577, 651**
 Мембранный транспорт **1: 550–581**
 — ABC-транспортёры **1: 564, 566**
 — АТФ-зависимый **1: 563**
 — АТФ-синтаза **1: 63, 564**
 — Ca^{2+} -насос **1: 560**
 — SERCA **1: 560, 561**
 — Na^+K^+ -АТРаза **1: 562**
 — аквапорины **1: 570–573**
 — активный **1: 558**
 — первичный **1: 558**
 — вторичный **1: 558, 567**
 — антипорт **1: 558**
 — в нейронах **2: 578; 2: 590**
 — глюкозы **1: 553–556**
 — изменение свободной энергии **1: 552**
 — ионный градиент **1: 567**
 — ионофоры **1: 570**
 — котранспортные системы **1: 558**
 — липидов **2: 478**
 — мембранный потенциал **1: 551**
 — облегченная диффузия (пассивный транспорт) **1: 552**
 — пассивный **1: 552**
 — порины **1: 535**
 — симпорт **1: 558**
 — энергетические затраты **1: 569**
 — транспортёры, см. Ионные каналы; Переносчики; Транспортёры
 — унипорт **1: 558**
 — факторы, облегчающие транспорт (MFS) **1: 569**
 — хлоридно-бикарбонатный обменник **1: 556, 557**
 — электрогенный **1: 559**
 — электронейтральный **1: 558**
 — электрохимический градиент **1: 551**
 Мембраны **1: 525–549**
 — асимметрия **1: 528, 530**
 — динамика **1: 538–540**
 — диффузия молекул **1: 540**
 — двойной липидный слой **1: 528, 529**
 — основные состояния **1: 539**
 — кавеолы **1: 546**
 — модель строения **1: 527, 528**
 — плазматическая
 — белки **1: 530, 537, 549**
 — липидный состав **1: 527, 530**
 — нервных клеток **2: 590**
 — проницаемость **1: 85, 527**
 — рафты **1: 543, 545**
 — связывание белков **3: 207, 214, 218**
 — состав у разных организмов **1: 526**
 — трансмембранный потенциал **1: 633**
 — поляризация **1: 633, 634**
 — слияние **1: 546–548**
 — в синапсах **1: 548**
 Менахинон (витамин K_2) **1: 512**
 Ментен Мод **1: 287**
 Меринг (фон) Йозеф **2: 568**
 Меромиозин **1: 257**
 Меррифилд Р. Брюс **1: 152, 423**
 Мерцающие кластеры **1: 75**
 Метаболизм **1: 48; 2: 7, 579**
 — анаэробный, у целакантов **2: 92**
 — аэробный, у позвоночных **2: 92**
 — в головном мозге **2: 590, 591**
 — в жировой ткани **2: 585–587**
 — в мышцах **2: 587–590**
 — в печени **2: 579–585**
 — внутренние перегруппировки **2: 23, 24**
 — и биоэнергетика **2: 12–19**
 — окислительно-восстановительные реакции **2: 26, 27**
 — промежуточный **2: 7**
 — реакции с переносом групп **2: 25, 26**
 — регуляция по принципу обратной связи **1: 49**
 — роль АТФ **1: 49**
 — свободно-радикальные реакции **2: 25**
 — функция крови **2: 591, 592**
 Метаболиты **1: 18, 32; 2: 7, 122**
 — вторичные **1: 32**
 — изменение концентрации **2: 128–131**
 — пул, в растениях **2: 437, 438**
 Метаболическая вода **1: 104, 105**
 Метаболические пути **1: 48; 2: 7–9**
 — анаболические **2: 7**
 — близость к равновесию **2: 128, 129**
 — катаболические **2: 7**
 — конвергентные **2: 8**
 — дивергентные **2: 8**
 — циклические **2: 8**
 Метаболический алкалоз **1: 93**
 Метаболический ацидоз **1: 93, 102**
 Метаболический контроль **2: 127, 132**
 — анализ **2: 134–138**
 Метаболический синдром **2: 615–618**
 Метаболом **1: 32; 2: 126**
 Метаболон **2: 210, 211**
 Металлопротеины **1: 131**
 Металлы
 — как катализаторы **1: 284, 285**
 — как кофакторы **1: 271, 309, 310**
 — как переносчики кислорода **1: 227**
 Метамерия **3: 272**
 Метан **2: 46**

- Метанол
– в экстракции липидов **1: 515–517**
– отравления **1: 297**
- Метиладенин, деметилирование **3: 75, 77**
- Метиладенозин **1: 395**
- Метиламин, pK_a **1: 124, 125**
- 7-Метилгуанозин **1: 395; 3: 75, 77**
- Метилирование
– в анализе сахаров **1: 379**
– в репарации ДНК **3: 74–77**
– нуклеиновых оснований **1: 418, 419, 435, 436**
– ферментов **1: 323**
- 6-N-Метиллизин **1: 120**
- Метилмалонил-СоА **2: 239**
- Метилмалонил-СоА-мутаза **2: 240, 243**
– дефекты **2: 287, 295**
– при пернициозной анемии **2: 284**
- Метилмалонил-СоА-эпимераза **2: 240**
- Метилмалонилполуальдегид **2: 556**
- Метилмалоновая ацидемия **2: 287, 295, 296**
- 5-Метилцитидин **1: 395**
- Метилцитозин, деметилирование **3: 68, 72, 75**
- Метионин **1: 118; 2: 523, 538, 542**
– биосинтез **2: 524, 531**
– превращение в сукцинил-СоА **2: 294**
- Метионинаденозилтрансфераза **2: 283**
- Метионинсинтаза **2: 283, 284**
- Метка экспрессируемой последовательности (EST) **1: 451**
- Метотрексат **2: 558, 559**
- Метэнкефалин **1: 68**
- Миелоидная оболочка **1: 502, 526**
- Микродомены мембраны **1: 543, 545**
- Микроинъекции ДНК **1: 473**
- Микроназ **2: 597**
- МикроРНК **3: 138, 270**
- Микроскопия атомно-силовая **1: 544**
- Микротрубочки **1: 24, 25, 257**
- Миллера–Юри эксперимент **1: 55, 56**
- Мильштейн Сезар **1: 254**
- Минералокортикоиды **2: 496, 575**
– синтез **2: 348**
- Минихромосомы, белки МСМ **3: 64, 65**
- Минковски Оскар **2: 568**
- Минус-зеленые дихроматы **1: 655**
- Минус-красные дихроматы **1: 655**
- Миоглобин **1: 129, 139, 194, 200, 234**
– гемовая группа **1: 195**
– изучение методом ЯМР **1: 197–199**
– рентгеноструктурный анализ **1: 194, 196, 197**
– связывание кислорода **1: 226, 228–233**
- Миозин **1: 257**
– в мышечном сокращении **1: 260–262**
– взаимодействие с актином **1: 257, 260–262**
– суперспираль **1: 257**
– толстые нити **1: 258**
– фосфорилирование **1: 665**
- Миокарда инфаркт **2: 140, 141**
- Миоклоническая эпилепсия с разорванными красными мышечными волокнами (МЭРКМВ) **2: 351, 356**
- Миофибриллы **1: 258, 259**
- Миоцит **2: 140, 141, 166, 229, 587**
– контроль синтеза гликогена **2: 137**
- Миристиновая кислота **1: 488**
- Миристоильная группа **1: 323, 537, 545**
- миРНК **3: 270**
- мир РНК, гипотеза **1: 57; 3: 153–159**
- Митоз **1: 660, 662, 663**
- Митохондриальная ДНК, см. мтДНК
- Митохондриальная энцефаломиопатия **2: 354**
- Митохондриальное дыхание **2: 420**
- Митохондриальные гены, мутации **2: 353–356**
- Митохондрии
– АТФ-синтазный комплекс **2: 331–336**
– механизм вращательного катализа **2: 336–338**
– при гипоксии **2: 344, 345**
– апоптоз **2: 350**
– в растениях, альтернативный путь окисления NADH **2: 325, 326**
– вариации генетического кода **3: 172, 177**
– гены **2: 351**
– и диабет **2: 355, 356**
– мутации **2: 353–355**
– гетероплазмия **2: 354**
– гомоплазмия **2: 354**
– ДНК, см. мтДНК
– доставка NADH из цитозоля **2: 340–342**
– доставка белков **3: 210, 215**
– и ксенобиотики **2: 349**
– и старение **2: 346, 353**
– и хемиосмотическая теория **2: 306, 327, 328**
– матрикс **2: 307**
– мембранные переносчики **2: 309**
– мембраны **2: 307**
– образование активных форм кислорода **2: 324, 345**
– β -окисление **2: 232–237**
– ферменты, отличие от ферментов пероксисом и глиоксисом **2: 248**
– отношение концентраций NADH/NAD⁺ **2: 102**
– происхождение **2: 352, 353**
– реакции переноса электронов **2: 306–320**
– разобращение **2: 329, 330**
– респирасомы **2: 320, 321**
– синтез АТФ **2: 237, 327–338**
– выход **2: 343**
– регуляция **2: 346, 347**
– синтез стероидов **2: 348, 349**
– строение **2: 307**
– термогенез **2: 348**
– типы цитохромов **2: 309, 310**
– транспорт жирных кислот **2: 230–232**
- Митчелл Питер **2: 305, 306, 327**
- Мифепристон **1: 644**
- Михаэлис Леонор **1: 287**
- Михаэлиса кинетика **1: 287–290**
- Михаэлиса константа (K_M) **1: 288, 290, 291**
– кажущаяся **1: 295, 296**
- Михаэлиса–Ментен уравнение **1: 288**
– интерпретация параметров **1: 290**
– преобразования **1: 289**
- Мицеллы **1: 80, 81, 529**
- Мишер Фридрих **1: 400**
- Млекопитающие
– аквапорины **1: 571**
– жировые запасы **1: 491–495**
– клонирование **1: 473–479**
– концентрация глюкозы в крови **1: 354**
– повреждение ДНК **1: 416, 417**
– протеогликаны **1: 364**
– сигнальные пути **1: 646, 647**
- Мобильные элементы **3: 94, 148**
- Модуляторы, в связывании белков с лигандами **1: 320**
- Мозаичная модель мембран **1: 589**
- Молекулярная масса **1: 32**
- Молекулярные паразиты **1: 460; 3: 94, 155**
- Мологоголовый рибозим **3: 138, 139**
- Молочная кислота **1: 522**
- Молочнокислое брожение **2: 69, 91**
– при сокращении мышц **2: 92**
– роль пирувата **2: 91**

- Молчащие мутации **3: 67**
Моно Жак **1: 9, 28, 242, 408; 3: 234**
Моногалактозилдиацилглицерин (МГДГ) **1: 499**
Моноклональные антитела **1: 254, 308, 479**
--- в противораковой терапии **1: 669**
--- каталитические **1: 308**
Моноксигеназы **2: 460**
Моноксид азота (NO) **1: 628; 2: 576**
--- в роли гормона **2: 572, 576**
--- при стенокардии **1: 628**
--- синтез из аргинина **2: 542, 543**
Моноксид углерода
--- отравление **1: 240, 241**
--- связывание с гемоглобином **1: 228, 240, 241**
--- физиологическое действие **1: 240, 241**
Моносахариды **1: 339, 340, 347**
- D- и L-изомеры **1: 341**
- альдоза **1: 341, 342**
- в гликолизе **2: 87**
- восстанавливающие свойства **1: 347**
- гексоза **1: 341, 345**
--- производные **1: 346, 347**
- гептоза **1: 341**
- кетозы **1: 341, 342**
- конформация **1: 345**
- мутаротация **1: 344**
- номенклатура **1: 341–343**
- образование при гидролизе дисахаридов и полисахаридов **2: 86**
- окисление **1: 347**
- пентоза **1: 341**
- пиранозы **1: 344**
- полуацеталь **1: 343**
- полукеталь **1: 343**
- тетроза **1: 341**
- триоза **1: 341**
- фосфорилирование **1: 347**
- фураноза **1: 344**
- хиральные центры **1: 341**
- циклические формы **1: 344**
--- формулы Хеуорса **1: 345**
- энантиомеры **1: 341**
- эписмеры **1: 343**
Моно-Уаймена-Шанже модель **1: 242, 243**
Моноцистронная мРНК **1: 408**
Морфогены **3: 273, 275**
Мотивы белковые **1: 200–203**
- ДНК-связывающие **3: 237–242**
Моторные белки **1: 256–262**
Мочевая кислота **2: 555**
Мочевина **2: 273, 601**
- в метаболизме аминокислот **2: 263, 583, 584**
- в метаболизме пиримидинов **2: 555, 556**
мРНК (матричная РНК) **1: 391, 408; 3: 105**
- в эволюции **1: 56**
- время полужизни **3: 142**
- длина **1: 408**
- искусственная **3: 167**
- 5'-кэп **3: 123**
- материнская **3: 273**
- моноцистронная **1: 408**
- поли(А)-«хвост» **3: 122, 123, 130**
- полицистронная **1: 408**
- процессинг **3: 122–133**
- расщепление **3: 142**
- редактирование **3: 176**
- скорость синтеза **2: 124**
- спаривание оснований с тРНК **3: 173, 174**
- сплайсинг **3: 122, 125**
- стабильность **2: 124**
- функции **1: 408**
- шпильки **1: 406; 3: 142**
МСГ (меланоцитстимулирующий гормон), см. Меланокортин
мтДНК (митохондриальная ДНК) **3: 172**
- вариации генетического кода **3: 172, 173**
Мультимер **1: 205**
Мультисубъединичные белки **1: 130, 240**
Мультифункциональный белок (MFP) **2: 248**
Муравьиная кислота **2: 45**
Мурамовая кислота **1: 346**
Мусорная ДНК **3: 156**
Мутагенез
- олигонуклеотид-направленный **1: 446**
- сайт-направленный **1: 446, 447**
Мутазаы **2: 87**
Мутаротация **1: 344**
Мутации **1: 54, 415; 3: 67**
- ацил-СоА-дегидрогеназ **2: 245**
- в цикле лимонной кислоты, при раке **2: 211**
- в эволюции **1: 54, 55; 3: 278–280**
- глутаматдегидрогеназы **2: 270**
- дегидрогеназы СоА-производных жирных кислот **2: 245**
- делеции **3: 67**
- замены **3: 67**
- и апоптоз **2: 666**
- и окислительный стресс **1: 419; 2: 316**
- инсерции **3: 67**
- канцерогенные **1: 601, 666–671; 3: 67, 79**
- митохондриальных генов, см. Митохондрии
- молчащие **3: 67**
- нонсенс **3: 203**
- под действием излучения **1: 417**
- при амилоидозе **1: 215**
- при кистозном фиброзе **1: 565, 579**
- при ретинобластоме **1: 670**
- при сахарном диабете **2: 152, 153, 355, 597**
- при синдроме Вернике-Корсакова **2: 112**
- при тромбастении **1: 642**
- роль алкилирующих агентов **1: 418, 419**
- супрессоров **3: 203**
Муцины **1: 368**
Мышечные белки **1: 258–262**
--- актин **1: 257**
--- миоглобин **1: 194**
--- миозин **1: 257**
--- тропонин **1: 201, 261**
Мышечные волокна **1: 258, 259**
Мышечные сокращения **1: 260–262**
--- быстрые **2: 587**
--- источники энергии **2: 588, 589**
--- медленные **2: 587**
--- функция АТФ **1: 260, 261**
Мыши, трансгенные **1: 477, 478**
Мышцы
- белки, см. Мышечные белки
- белые **2: 587**
- выведение аммиака **2: 272**
- источники энергии **2: 588, 589**
- красные **2: 587**
--- МЭРКМВ **2: 351, 356**
- метаболизм **2: 588–590**
--- углеводов **2: 173**
- сердечные **2: 589**
- структура **1: 258, 259**
Мэдсен Нейл **2: 212**
МЭРКМВ (миоклоническая эпилепсия с разорванными красными мышечными волокнами) **2: 351, 356**
Н
Надмолекулярные комплексы **1: 18, 27, 33**
Направляющая РНК **3: 176**
Натриевые каналы **1: 578, 579, 635–637**
--- в сигнальных путях **1: 627, 628**

- Натрий
 – содержание в крови **2: 592**
 – транспортная АТРаза **1: 569, 633**
 Натрий-глюкозный симпорт **1: 569**
 Надпочечники **2: 495**
 Налидиксовая кислота **3: 24**
 Напроксен **2: 462**
 Наследственная (семейная) гиперхолестеринемия **2: 493–495**
 Наследственная нейропатия зрительного нерва Лебера **2: 351, 354**
 Наследственный неполипозный рак толстой кишки **3: 80**
 Натансон Даниэль **1: 436**
 Нативная конформация (белка) **1: 53, 172**
 Начальная скорость (v_0) **1: 286**
 Небулин **1: 259**
 Невосстанавливающие концы **1: 347, 354**
 Неер Эрвин **1: 575**
 Незаменимые аминокислоты **2: 278, 523, 524**; см. также Аминокислоты
 Незаменимые жирные кислоты **2: 459**
 Нейромедиаторы
 – биосинтез из аминокислот **2: 538, 539**
 – в роли гормонов **2: 566**
 – высвобождение **1: 635, 636**
 – при слиянии мембран **1: 548**
 – рецепторы **1: 638, 639**
 Нейроны
 – Na^+ -каналы **1: 578, 635–637**
 – анорексигенные **2: 607–609**
 – вкусовые **1: 656**
 – зрительные **1: 650–656**
 – мембранный транспорт **2: 590**
 – обонятельные **1: 656**
 – орексигенные **2: 607, 608**
 – светочувствительные **1: 650**
 Нейропептид Y (NPY) **2: 607**
 Нейроэндокринная система **2: 566**
 Нейтральное значение pH **1: 91, 92**
 Нейтральные гликолипиды **1: 502**
 Нейтральные жиры, см. Триацилглицерины
 Нековалентное связывание, см. Слабые взаимодействия
 Некодирующая РНК (нкРНК) **3: 271**
 Неконкурентный ингибитор **1: 297**
 Нексавар (сорафениб) **1: 669**
 Необратимые ингибиторы **1: 295, 298**
 Неокислительная стадия пентозофосфатного пути **2: 108, 109**
 Неравновесные стадии метаболических путей **2: 128, 129**
 Нерв Лебера, наследственная нейропатия **2: 351, 354**
 Нервная сигнализация **2: 566**
 Нервный импульс, передача **1: 636**
 Несвершенный остеогенез **1: 191**
 Нестероидные противовоспалительные средства (НПВС) **1: 508; 2: 462, 463**
 Ниацин (никотиновая кислота) **2: 53, 54**
 Никотин **2: 53**
 Никотинамид **2: 53**
 Никотинамидадениндинуклеотид, см. NAD^+
 Никотинамидадениндинуклеотид-фосфат, см. NADP^+
 Никотинамиднуклеотидсодержащие дегидрогеназы **2: 307, 308**
 Никотиновая кислота, см. Ниацин
 Никотиновый ацетилхолиновый рецептор **1: 578, 579 638**
 – агрегаты в синапсах **1: 542**
 – дефекты **1: 579**
 – открытая/закрытая конформация **1: 638, 639**
 Ник-трансляция **3: 53**
 Нимана–Пика болезнь **1: 505**
 Ниренберг Маршалл **3: 167**
 Нитрификация **2: 507**
 Нитрогеназный комплекс **2: 510–513**
 Нитроглицерин **1: 628**
 нкРНК (некодирующая РНК) **3: 271**
 Номура Масайасу **3: 180**
 Нонсенс-кодоны **3: 170, 203**
 Нонсенс-мутации **3: 203**
 Нонсенс-супрессоры **3: 203**
 Норадреналин **2: 538, 567, 574, 602**
 Нортроп Джон **1: 270**
 НПВС (нестероидные противовоспалительные средства) **1: 508; 2: 462, 463**
 Нуклеазы **3: 48**
 Нуклеин **1: 400**
 Нуклеиновые кислоты **1: 33, 391–399**
 – гибриды **1: 414, 415**
 – гидрофильный остов **1: 396**
 – ДНК **1: 393, 394, 400–403**; см. также ДНК
 – 3'-конец **1: 396**
 – 5'-конец **1: 396**
 – пространственное строение **1: 403–408**
 – зонды **1: 443**
 – неферментативные превращения **1: 415–419**
 – определение последовательности **1: 419–422**
 – полярность **1: 396**
 – РНК **1: 393, 394, 408**; см. также РНК
 – пространственное строение **1: 409–412**
 – состав **1: 392–396**
 – синтез, см. Репликация; Транскрипция
 – фосфодиэфирные связи **1: 396**
 – функции **1: 391**
 – химический синтез **1: 422–424**
 Нуклеозиддифосфаткиназа **2: 41, 198, 550**
 – механизм пинг-понг **2: 41**
 Нуклеозиддифосфаты **1: 424**
 Нуклеозидмонофосфаткиназы **2: 550**
 Нуклеозидмонофосфаты **1: 424, 550**
 – превращение в нуклеозидтрифосфаты **2: 550**
 Нуклеозидтрифосфаты **1: 424**
 – образование из нуклеозидмонофосфатов **2: 550**
 Нуклеозиды **1: 393, 394; 3: 49, 51**
 Нуклеоид **1: 18, 21; 3: 36, 37**
 Нуклеосомы **3: 27, 28**
 – ацелирование **3: 258**
 – сборка хроматина **3: 28–31**
 – фибриллы **3: 31**
 5'-Нуклеотидаза **2: 555**
 Нуклеотидная последовательность
 – в эволюционных исследованиях **1: 158, 159**
 – и аминокислотная последовательность **1: 148, 152; 3: 171**
 – определение **1: 419–424**
 Нуклеотидсвязывающий мотив **1: 425**
 Нуклеотиды **1: 391–394**
 – биосинтез **2: 543–554**
 – реутилизация **2: 556**
 – гидролиз N- β -гликозидной связи **1: 416, 417**
 – депуринизация **1: 416, 417**
 – как кофакторы и коферменты **1: 425, 426; 2: 52, 54**
 – как сигнальные молекулы **1: 427**
 – как универсальные переносчики электронов **2: 49, 50**
 – метаболизм **2: 543–557**
 – образование мочевины и мочевой кислоты **2: 555–557**
 – неферментативные реакции **1: 415–419**
 – сахаронуклеотиды **2: 158, 428**
 – сокращенные обозначения **1: 392, 394**

- состав **1: 392**
 - спектр поглощения **1: 398**
 - структура **1: 392**
 - трансфосфорилирование **2: 40, 41**
 - триплеты, см. Кодоны
 - ферменты биосинтеза как мишени противоопухолевой терапии **2: 558–560**
 - флавиновые **1: 426; 2: 54, 55**
 - фосфаты, как переносчики химической энергии **1: 424, 425**
 - фосфодиэфирные связи **1: 396**
 - и фосфоэфирные связи **1: 425**
 - эволюция **1: 54, 56; 3: 151–155**
 - Нуклеофил **2: 21**
 - Нуклеофильное замещение в реакциях АТФ **2: 37–39**
 - Нюсляйн-Фольхард Кристиана **3: 273**
- О**
- Обесцвечивание флуоресценции (FRAP) **1: 541, 542**
 - Облегченная диффузия **1: 552, 553; см. также** Переносчики
 - Обмен головками, в синтезе фосфолипидов **2: 472**
 - Обратимые ингибиторы **1: 295**
 - Обратная транскриптаза **3: 144**
 - Обходные реакции глюконеогенеза **2: 98–103**
 - Общий кислотнo-основной катализ **1: 283, 284**
 - Один ген – один белок, гипотеза **3: 8**
 - Ожирение **2: 600, 604–614**
 - Оказки фрагменты **3: 48**
 - Окаймленные пузырьки **3: 219**
 - Окисление
 - аминокислот, см. Аминокислоты, окисление
 - ацетата **2: 202**
 - в пентозофосфатном пути **2: 107**
 - в цикле лимонной кислоты **2: 188–199**
 - изоцитрата до α -кетоглутарата и CO_2 **2: 192**
 - α -кетоглутарата до сукцинил-СоА и CO_2 **2: 194, 195**
 - малата до оксалоацетата **2: 199**
 - пирувата до ацетил-СоА и CO_2 **2: 69, 182–187**
 - сукцината до fumarата **2: 198**
 - глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-бисфосфоглицерата **2: 76**
 - глюкозы **2: 49**
 - выход АТФ **2: 80**
 - жирных кислот
 - α -окисление **2: 250**
 - β -окисление **2: 232–236, 245–248**
 - образование ацетил-СоА и АТФ **2: 232–235**
 - ω -окисление **2: 249**
 - углерода в биологических процессах **2: 21, 27, 45**
 - Окислительно-восстановительные реакции **1: 43; 2: 26, 27**
 - восстановительный потенциал **2: 47, 48**
 - и дегидрирование **2: 45**
 - полуреакции **2: 44**
 - электродвижущая сила **2: 44**
 - Окислительное дезаминирование **2: 270**
 - Окислительное декарбоксилирование **2: 183**
 - Окислительное фосфорилирование **2: 305–346**
 - в сердечной мышце **2: 589**
 - выход АТФ **2: 343**
 - и активные формы кислорода **2: 324, 345**
 - и субстратное фосфорилирование **2: 78**
 - ингибирование гидролиза АТФ **2: 344**
 - мембранные переносчики **2: 309–313**
 - полиферментные комплексы **2: 313–320**
 - разобщение **2: 329, 330, 348**
 - термогенин **2: 348**
 - регуляция **2: 343–347**
 - респирасомы **2: 320**
 - синтез АТФ **2: 327–342**
 - вращательный катализ **2: 336–339**
 - регуляция **2: 346, 347**
 - термогенез в бурой жировой ткани **2: 347, 348**
 - функция митохондрий **2: 306, 307, 347; см. также** Митохондрии
 - хемиосмотическая теория **2: 306, 327**
 - электрохимический потенциал **2: 322, 323**
 - Окислительные стадии пентозофосфатного пути **2: 108, 109**
 - Окислительный пентозофосфатный путь **2: 111, 419, 435, 438**
 - Окислительный стресс, роль митохондрий **2: 355**
 - Оксалоацетат **2: 100**
 - в C_4 -пути **2: 424, 425**
 - в глиоксилатном цикле **2: 212–214**
 - в синтезе аминокислот **2: 518, 523, 524**
 - в цикле лимонной кислоты **2: 190, 191, 199, 205**
 - как продукт окисления малата **2: 102, 199**
 - как продукт превращения глюкогенных аминокислот **2: 104, 280**
 - как продукт расщепления аспарагина и аспартата **2: 274, 297, 298**
 - Оксигеназы **2: 659, 560**
 - со смешанной функцией **2: 460**
 - Оксидазы **2: 27, 250**
 - со смешанной функцией **2: 291, 458–460, 477, 478, 483, 496**
 - Оксидоредуктазы **2: 51**
 - Окситоцин **2: 577**
 - Оксоглутарат, см. α -Кетоглутарат
 - Октадекадиеновая кислота **1: 488**
 - Октадекановая кислота **1: 488**
 - Октадекатриеновая кислота **1: 488**
 - Октадеценовая кислота **1: 488**
 - Олеат **2: 238**
 - синтез **2: 458, 459**
 - Олеиновая кислота **1: 488**
 - Олигомеры **1: 32, 130**
 - Олигонуклеотид-направленный мутагенез **1: 446**
 - Олигонуклеотиды **1: 397, 423**
 - Олигопептиды **1: 128**
 - Олигосахариды **1: 33, 339; см. также** Дисахариды; Полисахариды; Углеводы
 - анализ **1: 379–381**
 - в ганглиозидах **1: 502**
 - в гликопротеинах **1: 363, 368–371; 3: 207, 213**
 - в гликофрине **1: 527, 531**
 - взаимодействие с лектинами **1: 372–378**
 - конформация **1: 357**
 - номенклатура **1: 351**
 - N-связанные **1: 368; 3: 207, 213, 214**
 - O-связанные **1: 368; 3: 207, 214**
 - синтез **2: 403–438**
 - структура **1: 371**
 - химический синтез **1: 381**
 - Олтан Сидней **3: 141**
 - Онкогены **1: 666–670**
 - мутации **1: 671; 3: 146, 207**
 - Оператор **3: 232**
 - Оперон **3: 234**
 - *his* **3: 247**
 - *lac* **3: 234–236**
 - *leu* **3: 247**
 - *phe* **3: 247**

- *trp* **3: 246–249**
 - регуляция **3: 234–236**
 - Опины **1: 469, 470**
 - Опсины **1: 652, 655**; *см. также* Родопсин
 - Оптическая активность **1: 37, 117**
 - Опухоль **1: 666, 671**
 - анализ на микрочипах **1: 465, 466**
 - в растениях **1: 470**
 - гены супрессоров **1: 666, 667, 670**
 - методы лечения **1: 476, 477, 667–669**
 - промоторы **1: 611**
 - роль р53 **1: 671**
 - транскрипционный профиль **1: 466**
 - фактор некроза (TNF) **1: 477, 672**
 - Органеллы **1: 22–25**
 - разделение **1: 23**
 - растений **2: 358, 405**
 - Органические растворители, экстракция липидов **1: 510, 515, 516**
 - Органотрофы **1: 20**
 - Оргел Лесли **3: 152**
 - Ориджин **3: 48**
 - Орексигенные нейроны **2: 607, 608**
 - Ориджин-независимое начало репликации **3: 89**
 - Орнитин **1: 122, 123; 2: 519**
 - в цикле мочевины **2: 273–275**
 - Орнитин-δ-аминотрансфераза **2: 519, 521**
 - Орнитиндекарбоксилаза **2: 540–542**
 - Орнитинтранскарбамоилаза **2: 273**
 - Оротат **2: 543**
 - Ортологи **1: 61, 157, 462**
 - Осельтамивир (тамифлю) **1: 374**
 - Осмолярность **1: 85**
 - Осмоз **1: 85, 86**
 - Осмотический лизис **1: 86**
 - Основания
 - азотистые (в нуклеотидах) **1: 26, 392**; *см. также* Пиримидины; Пурины
 - алкилированные, репарация **3: 74–77**
 - анти-форма **1: 403, 404**
 - в кодонах **3: 171**
 - водородные связи **1: 399**
 - дезаминирование **1: 416–418**
 - и азотистая кислота **1: 418**
 - качающиеся пары **3: 172–175**
 - метилирование **1: 419**
 - минорные **1: 395**
 - син-форма **1: 403, 404**
 - спаривание **1: 399**
 - таутомерные формы **1: 398**
 - функциональные группы **1: 398**
 - химические свойства **1: 397, 398**
 - Чаргаффа правила **1: 400**
 - аминокислот **1: 123**
 - в буферных системах **1: 96–98**
 - слабые **1: 89, 93**
 - Основное состояние **1: 274; 2: 361**
 - Основные транскрипционные факторы **3: 118, 120**
 - Островковые клетки (клетки Лангерганса) **2: 595**
 - Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) **2: 523**
 - Острый миелоидный лейкоз **1: 668**
 - Отжиг ДНК **1: 410, 413, 414, 420**
 - Открытая рамка считывания **3: 171**
 - Открытая система **1: 41**
 - Относительная молекулярная масса (Mr) **1: 32**
 - Отравление моллюсками **1: 581**
 - Отстающая цепь **3: 48**
 - Очоа Северо **2: 83, 160, 359; 3: 142, 143**
- П**
- Паладе Джордж **3: 211**
 - Палиндромная ДНК **1: 405**
 - Пальмитат
 - в синтезе жирных кислот **2: 452–454, 458**
 - десатурация **2: 458**
 - синтез **2: 449, 452–454**
 - Пальмитиновая кислота **1: 488**
 - Пальмитоильная группа
 - окисление **2: 235, 236**
 - пальмитоил-СоА **2: 458**
 - связывание с мембраной **1: 543, 545**
 - Пальмитолеиновая кислота **1: 488**
 - Пальмитолеат, синтез **2: 458**
 - Панкреатит острый **2: 266**
 - Панкреатические клетки
 - α **2: 595**
 - β **2: 595, 596, 615**
 - Панкреатический ингибитор трипсина **2: 264**
 - Паразиты молекулярные, эволюция **3: 94, 155**
 - Паракринные гормоны **2: 571, 574**
 - эйкозаноиды **1: 507**
 - Паралоги **1: 61, 157, 462**
 - Парамизоин **1: 260**
 - Парацитоидная железа **2: 576**
 - Паркинсона болезнь, аномалия фолдинга **1: 215, 217**
 - Парного правила гены **3: 274**
 - Пассивный транспорт **1: 552, 553**
 - Пастер Луи **1: 36, 37; 2: 80**
 - Пейс Норман **3: 141**
 - Пеллагра **2: 63**
 - Пенициллин
 - ген устойчивости на плаزمидах **3: 10**
 - механизм действия **1: 314**
 - Пентозофосфатный (фосфоглюконатный, гексозомонофосфатный) путь **2: 107, 406, 438**
 - восстановительный **2: 112, 406**
 - и гликолиз **2: 112**
 - неокислительный этап **2: 108, 109, 406–415**
 - общая схема **2: 108**
 - окислительный этап **2: 108, 109**
 - окислительный **2: 108, 111**
 - синдром Вернике–Корсакова **2: 112**
 - синтез NADPH **2: 107**
 - функция глюкозо-6-фосфата **2: 109, 112, 582**
 - дефект Г6ФДГ **2: 106**
- Пентозофосфаты **2: 82, 109**
- превращения **2: 412**
- синтез в цикле Кальвина **2: 406**
- Пентозы **1: 341**
- в нуклеиновых кислотах **1: 396, 404**
- в нуклеотидах **1: 392**
- Пепсиноген **2: 264**
- Пептидилпролил-*цис*-транс-изомеразы (PPI) **1: 214**
- Пептидилтрансфераза **3: 200**
- Пептидильный (P) сайт рибосомы **3: 197–202**
- Пептидная группа **1: 174**
- Пептидная связь **1: 127, 175**
- в α-спирали **1: 177**
- образование в синтезе белка **3: 200**
- *транс*-конфигурация **1: 182**
- *цис*-конфигурация **1: 182**
- Пептидные гормоны **2: 567, 569–574**
- Пептидогликаны **1: 362; 2: 433**
- ингибирование синтеза пенициллином **1: 314, 315**
- синтез в бактериях **2: 433, 434**
- Пептиды **1: 127**; *см. также* Белки; Полипептиды
- аминокислотный состав **1: 127, 128**
- ионизация **1: 128**
- номенклатура **1: 128**
- определение последовательности **1: 143–145, 147**
- химический синтез **1: 152–154**
- Первичная структура белка **1: 141**
- анализ **1: 143–151**

- Первичный активный транспорт
1: 558
- Первичный бульон 1: 56–58
- Первичный системный амилоидоз
1: 215
- Первичный транскрипт 3: 122
— процессинг 3: 122–143
— сплайсинг 3: 122, 125
- Передняя доля гипофиза 2: 566, 567
- Переключатели, в G-белках
1: 599–602
- Переключение типа спаривания у
дрозофил 3: 256
- Перенос генов, латеральный 1: 157
- Переносчики 1: 271, 525, 540, 552,
558, 560 *см. также* Ионные
каналы; Транспортёры
— ABC 1: 565; 2: 489
— Ca²⁺-насос 1: 560, 561
— F-типа АТФазы 1: 563
— GLUT 1: 553–556
— Na⁺/K⁺-АТФазы 1: 562
— Na⁺/глюкозный симпорт 1: 569,
570
— P-типа АТФазы 1: 560
— SERCA насос 1: 560, 561
— V-типа АТФазы 1: 564
— активные 1: 553
— аланин как переносчик аммиака
2: 271, 272
— ацилкарнитинный/карнитинный
2: 230–232
— глутамин как переносчик аммиака
2: 270
— глюкозы 2: 553–570
— Na⁺/глюкозный симпорт 1: 569,
570
— в кишечнике (GLUT2) 1: 556, 569
— в мышцах (GLUT4) 1: 556
— в эритроцитах (GLUT1) 1:
553–555
— дефекты при диабете 1: 556
— жирных кислот 2: 229–232
— и ионные каналы 1: 552, 553
— ионофоры 1: 570
— котранспортные системы 1: 567
— коферменты как переносчики
электронов, атомов и функцио-
нальных групп 1: 271
— лактозы 1: 567, 568, 588
— липидов 2: 485–487
— мальтозы 1: 536
— мультилекарственные 1: 564
— пассивные 1: 553
— скрамблазы 1: 541
— флипазы 1: 541
— флопазы 1: 541
— фосфолипидов 1: 540
— цитрата 2: 455
- Переходное состояние
— аналоги 1: 307
— в ферментативной реакции 1: 47,
48, 268, 274, 306
— комплементарность ферменту
1: 279, 280, 306–308
- Перилипин 2: 228, 229
- Пермеазы 1: 552, 567
- Пернициозная анемия 2: 284
- Пероксисома 2: 213, 245, 246
- PPAR 2: 244, 612
— метаболизм липидов 2: 421, 422
— растений 2: 247
- Перутц Макс 1: 205
- Петли
— в белковых структурах 1: 200, 201
— β-α-β 1: 202
— ДНК 1: 414, 417; 3: 37, 47
— РНК 1: 409, 410
- Печень
— высвобождение аммиака глутама-
том 2: 263, 264, 269
— гликоген 1: 353
— глицеронеогенез 2: 469
— детоксикация 2: 585
— доставка аммония аланином 2: 271,
272
— каскад адреналина 1: 606
— метаболизм 2: 579, 580
— аминокислот 2: 582–584
— с разветвленной цепью 2: 296,
297
— гликогена 2: 154–164
— глутамина 2: 269, 270
— глюкозы 2: 581, 582
— жирных кислот 2: 584
— углеводов 2: 581, 582
— образование кетонных тел
2: 251–253
— рецикл триацилглицеринов 2: 467,
468
— синтез холестерина 2: 483, 484
— ферменты 2: 579, 589
- Пигментная ксеродерма 3: 79, 80
- Пигменты 2: 535, 536, *см. также*
Фотопигменты желчи
— зрительные 1: 511, 512, 514
— светопоглощающие *Halobacterium*
salarum 2: 388
- Пили 1: 21
- Пинг-понг (механизм реакции)
1: 293, 294
- Пиоглитазон (актос) 2: 612, 617
- Пиранозы 1: 344, 345
- Пиридиннуклеотиды 2: 51
- Пиридоксальфосфат 2: 266, 267
— в реакции гликогенфосфорилазы
2: 155
- Пиримидиновые димеры
— образование 1: 417
— репарация фотолизой 3: 74
- Пиримидиновые нуклеотиды,
см. Пиримидины
- Пиримидины 1: 392, 397, 398, 416
— биосинтез 2: 543
— катаболизм 2: 555
— реутилизация 2: 556
— синтез *de novo* 2: 548
- Пирофосфатаза неорганическая
2: 38, 39, 161
- Пирофосфорильная группа 2: 37, 73
- Пирролизин 3: 191
- Пируват
— альтернативные пути превращений
2: 69, 149
— в анаэробных реакциях
2: 204, 205
— в биосинтезе аминокислот 2: 518,
523
— в гликолизе 2: 66–70
— энергетический выход 2: 202,
343
— в глицеронеогенезе 2: 468
— в глюконеогенезе 2: 97, 99
— в молочнокислом брожении 2: 69
— в спиртовом брожении 2: 69, 93
— декарбоксилирование и дегидриро-
вание под действием ПДГ 2: 186
— как продукт расщепления амино-
кислот 2: 285, 288
— метаболизм в печени 2: 582–584
— окисление до ацетил-СоА и СО₂
2: 182, 183
— перенос из цитозоля в митохон-
дрии 2: 456
— превращение в фосфоенопируват
2: 100–103
— регуляция 2: 148, 149
— в растениях 2: 425
— при фенилкетонурии 2: 291
— таутомеризация 2: 79
- Пируватдегидрогеназа 2: 184
- Пируватдегидрогеназный комплекс
2: 182–187
— синтез ацетил-СоА 2: 186
- Пируватдекарбоксилаза 2: 93, 95
- Пируваткарбоксилаза 2: 100, 101,
149, 205
- Пируваткиназа 2: 32, 79, 128
— регуляция 2: 147, 148
- Пируват-фосфатдикиназа, в С₄-пути
2: 425, 426

- Питание, гормональный контроль
2: 607–615
- Питательные вещества
— перенос кровью 2: 591, 592
— расщепление в печени 2: 579
- Плазма крови 2: 591, 592
— белки 2: 592
— глюкоза 2: 592
— транспорт липопротеинов 2: 485–488
- Плазмалогены 1: 497, 499; 2: 476, 477
- Плазматическая мембрана
— глипиканы 1: 364, 365
— ионные каналы 1: 633–639
— липидные рафты 1: 632
— липополисахариды 1: 369, 370
— нейронов, транспорт веществ 1: 639
— проницаемость 1: 85, 573, 574
— связывание белков 3: 214
— связывание ДНК при репликации 3: 58
— синдекан 1: 364, 365
- Плазмидные вектора 1: 434, 436, 437, 439–443
— pBR322 1: 439
— T1 1: 469–471
- Плазмиды 1: 21, 439; 3: 10
- Плазмодесмы 2: 424, 425
- Планктомицеты 2: 508, 509
- Пластиды 2: 405, 406
— эволюция 1: 59
- Пластохинон 1: 512, 513
— PQA 2: 374, 376
- Пластоцианин 2: 373, 376, 373
- Плектонемическая спираль 3: 24–26
- Поворотная симметрия 1: 206
- β -Повороты 1: 182, 183
- Повторы ДНК 3: 56, 58, 94, 148, 238
- Поглощение света (A) 1: 121
— NAD⁺ и NADH 2: 50
— опсинами 1: 655
— спектр цитохрома c 2: 310
- Подагра 2: 557, 563
- Поджелудочная железа 2: 568
— в регуляции метаболизма глюкозы 2: 595, 596
- Полани Майкл 1: 280
- Поли(А)-«хвост» 3: 130, 156
- Полиаденилатполимераза 3: 130
- Полиакриламид, для электрофореза 1: 136
- Поликлональные антитела 1: 254
- Полилинкер 1: 437, 438
- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 1: 452, 453
— в методе отпечатков 1: 455–457
- Полимеразы, см. ДНК-полимеразы; РНК-полимеразы
- Полиморфизм 1: 142
— длины рестрикционных фрагментов 1: 455
— одного нуклеотида 1: 460
- Полиморфные белки 1: 142
- Полиненасыщенные жирные кислоты 1: 489
- Полинуклеотидкиназа 1: 435
- Полинуклеотидфосфатаза 3: 142
- Полинуклеотиды 1: 397
— синтетические 3: 142
- Полиовирус, симметрия 1: 207
- Полипептидная цепь, элонгация 3: 179, 180
- Полипептиды 1: 127, 128, см. также Пептиды
- Полисахариды 1: 340, 352–362, см. также Углеводы
— во внеклеточном матриксе 1: 359
— конформация 1: 357–358
— функции 1: 362
- Полисомы 3: 204
- Полиферментный комплекс в окислительном фосфорилировании
— комплекс I 2: 313–315
— комплекс II 2: 316–318
— комплекс III 2: 318
— комплекс IV 2: 318–320
— туннелирование субстрата 2: 187
- Полифосфат неорганический 2: 42
- Полифосфаткиназы 1 и 2 2: 42
- Полицистронная мРНК 1: 408
- Полностью *trans*-ретиналь 1: 511
- Половые гормоны 1: 509; 2: 574
— синтез 2: 348, 495, 574
- Полоса
— A 1: 259
— I 1: 259
- Полуацеталь 1: 434
- Полукеталь 1: 434
- Полуконсервативная репликация 3: 45
— стандартный восстановительный потенциал 2: 47
- Поляризация мембран, в передаче сигнала 1: 633–640
- Полярность
— аминокислот 1: 118
— определение 1: 534
— в эмбриональном развитии 3: 271, 273
— сегментов, гены 3: 274
- Полярные липиды, разделение 1: 515
- Помпе болезнь 2: 159
- Попьяк Джордж 2: 484
- Порины 1: 535, 536; 2: 306
- Портер Родни 1: 251
- Порфирин 2: 532
- Порфирия 2: 534
- Порфириновое кольцо 1: 227
- Порфобилиноген 2: 532
- Порядок зацепления (*Lk*) 3: 18
- Последовательность ядерной локализации (NLS) 3: 216, 217
- Посттрансляционная модификация белков 3: 179, 180, 206
- Потенциал мембранный (V_m) 1: 551
- Потенциалзависимые ионные каналы 1: 574–581
— в сигнальных путях 1: 635–639
- Поток метаболитов (*J*) 2: 123, 128, 133–137
— коэффициент управления (*C*) 2: 135
- Поток электронов
— в антеннах хлорофиллов 2: 374, 375
— в бактериях 2: 367, 368
— в хлоропластах 2: 372
— индуцированный светом 2: 367
— протонный градиент 2: 382, 383
— расщепление воды 2: 379, 380
— роль комплекса цитохрома *b6f* 2: 376, 377
- Почки
— аквапорины 1: 556, 571–573
— ионный баланс 2: 592
— метаболизм глутамина 2: 270, 271
— расщепление разветвленных аминокислот 2: 296
— эндокринная функция 2: 576
- Правастин (правахол) 2: 494
- Правахол (правастин) 2: 494
- Прадера–Вилли синдром 2: 614
- Праймаза 3: 55, 58, 59
- Праймер
— в репликации ДНК 3: 55
— в репликации РНК 3: 146
- Праймирование 2: 168
- Праймосома 3: 89
- Пребиотическая химия 1: 55, 56
- Преднизолон 1: 508, 509
- Преднизон 1: 508, 509
- Предстационарная кинетика 1: 287, 294
- Пренилирование 2: 496
- Пренилтрансфераза 2: 23
- Препроинсулин 2: 572
- Пререпликативный комплекс 3: 64
- Прерибосомная рРНК (пре-рРНК) 3: 117, 134, 135

- Прионные болезни **1: 217, 218**
 Прионы **1: 217, 218**
 Пробела гены **3: 273, 276**
 Пробелки **1: 328**
 Прогестерон, синтез **2: 495**
 Прогормоны **2: 572**
 Программируемая клеточная смерть, см. Апоптоз
 Проинсулин **2: 572, 573**
 Прокарбокисептидаза
 – А **2: 264**
 – В **2: 264**
 Прокариоты **1: 18**, см. также Бактерии
 Проллил-4-гидроксилаза **1: 190, 191**
 Пролин **1: 118; 2: 292**
 – биосинтез **2: 519, 520**
 – в активационных доменах **3:**
 – в коллагене **1: 187–191**
 – в β -поворотах **1: 182**
 – в β -слоях **1: 183**
 – в α -спиралях **1: 180**
 – превращение в α -кетоглутарат **2: 293**
 Промежуточное соединение **1: 305**
 Промежуточные филаменты **1: 24**
 --- белки **1: 185, 186**
 Промотор **3: 110, 231**
 – в экспрессирующих векторах **1: 444, 445**
 – опухоли **1: 611**
 – специфичность **3: 118, 232**
 Проницаемость мембран **1: 525, 527**
 Проопиомеланокортин (ПОМК) **1: 573**
 Пропионат **2: 239**
 Пропионил-СоА **2: 239, 240**
 Пропионил-СоА-карбоксилаза **2: 239**
 Пропластиды **2: 405**
 Пропранолол **1: 597**
 Прорастающие семена, глюконеогенез **2: 105, 436**
 Простагландин-Н₂-синтаза (цикло-оксигеназа) **2: 461**
 Простагландины **1: 508**
 – E1 **1: 508, 647**
 – G2 **2: 461**
 – H2 **2: 463**
 – синтез **2: 461, 462, 574**
 Простая транспозиция **3: 95**
 Простетическая группа **1: 131, 271**
 --- гем **1: 227**
 --- посттрансляционное присоединение **1: 227; 3: 207**
 Протеазы
 – аспартильные **1: 318**
 – в секвенировании белков **1: 146**
 – ингибиторы **1: 307, 314**
 – металлопротеиназы **1: 318**
 – сериновые **1: 303, 318**
 – цистеиновые **1: 318**
 Протеасома **1: 18, 663; 3: 220, 222**
 Протеинкиназы **1: 324; 2: 127**
 – А (РКА) **1: 599**
 --- активация **1: 599, 604**
 --- анализ методом FRET **1: 612–614**
 --- в β -адренергических путях **1: 605, 606**
 --- и АКАР **1: 608, 609**
 --- инактивация **1: 605–608**
 --- регуляция ферментов **1: 326, 565, 566, 605**
 – АМР-зависимая **2: 130, 131**
 – В (РКВ) **1: 622, 623**
 – С (РКС) **1: 507, 610, 611**
 --- и форболовые эфиры **1: 611**
 – G (РКГ) **1: 627, 628**
 – Ca²⁺/кальмодулин-зависимые **1: 614, 616**
 – сАМР-зависимые, см. Протеинкиназа А
 – сGMP-зависимые, см. Протеинкиназа G
 – аутоингибирование **1: 599, 630**
 – в регуляции клеточного цикла **1: 660–665**
 – в сигнальных путях **1: 595, 646**
 – в транскрипции **3: 120**
 – гистидиновые **1: 646–648**
 – как мишени в противоопухолевой терапии **1: 667–670; 2: 82**
 – консенсусные последовательности **1: 325, 327, 603**
 – рецепторные тирозинкиназы **1: 619–624**
 --- система JAK-STAT **1: 624, 625**
 – рецептороподобные, в растениях **1: 648, 649**
 – сопряженные с G-белком **1: 606, 607**
 – субстратная специфичность **1: 325–327**
 – фосфорилирующая активность **1: 325–328**
 – циклинзависимые **1: 660–665**
 Протеинфосфатазы **1: 606; 2: 127**
 Протеогликаны **1: 363–366**
 – агрегаты **1: 366**
 Протеолитический процессинг **3: 207, 221**
 – в активации белков **1: 328**
 Протеолитические ферменты, регуляция **1: 328, 663**
 Протеом **1: 461; 2: 126**
 Протеомика **1: 434**
 Противовирусные препараты **1: 374**
 Протомеры **1: 130, 205**
 Протондвижущая сила **2: 323, 327, 339**
 --- во вращении жгутиков **2: 352**
 Протонная помпа, см. АТРаза
 Протоны
 – градиент **2: 322–326, 382, 383**
 – перенос при кислотном-основном катализе **1: 283, 284**
 – прыжки **1: 84, 90, 572**
 Протоонкогены **1: 666**
 Протопорфирин **1: 227; 2: 310, 534**
 Протопорфириноген **2: 24**
 Протромбин **1: 512**
 Проферменты **1: 328**
 Прохиральные молекулы **2: 200**
 Процессивность ДНК-полимеразы **3: 50**
 Процессинг РНК **3: 122–143**
 Прузинер Стенли **1: 218**
 Прыгающие гены **3: 81**
 Прямая транспозиция **3: 95**
 Псевдоуридин **1: 395; 3: 128, 134, 135**
 Пуриновое кольцо, происхождение атомов **2: 544**
 Пуриновые нуклеотиды, см. Пурины
 Пуриновые основания **1: 392, 393**
 --- анти-форма **1: 403, 404**
 --- водородные связи **1: 399**
 --- дезаминирование **1: 416–418**
 --- минорные **1: 395**
 --- потеря **1: 416–418**
 --- реутилизация **2: 556**
 --- син-форма **1: 403, 404**
 --- таутомерные формы **1: 398, 419**
 --- Чаргаффа правила **1: 400**
 Пурины **1: 392, 397, 398, 416**
 – биосинтез **2: 543**
 – расщепление **2: 555**
 – регуляция синтеза **2: 547**
 – реутилизация **2: 556**
 – синтез *de novo* **2: 544, 545**
 Пуромидин **3: 208**
 Пурпурные бактерии **1: 60**
 – бактериородопсин **1: 533, 544**
 ПЦР (полимеразная цепная реакция) **1: 10, 452**
 Пэтч-кламп метод **1: 574, 575**
P
 Равновесие **1: 46, 47, 274; 2: 14**
 – константа (K_{eq}) **1: 47, 90, 94, 276; 2: 14–16**
 --- в метаболизме углеводов **2: 128, 129**

- ионизации воды **1: 90, 91**
- и изменение свободной энергии **1: 47; 2: 14–17**
- расчет **2: 18, 19**
- двух связанных реакций **2: 19**
- гидролиза АТФ **2: 18, 19, 27**
- Радикал **2: 21**
 - гидроксильный **2: 324**
 - свободный **2: 24, 25, 324**
 - супероксидный **2: 316, 324**
 - тирозиновый **2: 551**
- Радиоиммуноанализ **2: 569**
- Разветвляющийся фермент хлоропластов **2: 428**
 - в метаболизме гликогена **2: 156**
- Развитие, регуляция генов **3: 271–280**
- Разобщающий белок (термогенин) **2: 348, 586, 609**
- Райзинг **3: 20**
- Рак
 - АВС-транспортеры **1: 564, 565**
 - генная терапия **1: 475–477**
 - и гены супрессоров **1: 667, 670, 671**
 - и система репарации ДНК **3: 79, 80**
 - интегрины **1: 641, 642**
 - как осложнение генной терапии **1: 475–477**
 - как результат повреждений ДНК **1: 419**
 - кожи, при ксеродерме **3: 79**
 - лечение
 - генная терапия **1: 475–477**
 - ингибиторы топоизомераз **3: 24, 25**
 - ингибиторы протеинкиназ **1: 667–670; 2: 82**
 - ингибиторы ферментов биосинтеза нуклеотидов **2: 558, 559**
 - стероидные препараты **1: 644**
 - химиотерапия **1: 82; 2: 523, 558, 559; 3: 24, 25, 204**
 - метаболизм глюкозы **2: 81–83**
 - микрочипы в анализе **1: 466**
 - молочной железы **1: 644; 3: 80**
 - мутации **1: 601, 666–671; 2: 211; 3: 145, 207**
 - онкогены **1: 666–670**
 - ПЭТ-сканирование **2: 83**
 - ретровирусы **3: 146**
 - селектины **1: 374**
 - толстой кишки **1: 667; 3: 80**
 - мутации **1: 670, 671**
- Рамачандрана карта **1: 176**
- Рамка считывания **3: 167**
 - открытая **3: 171**
 - сдвиг **3: 175**
- Рамноза **1: 345**
- Раскручивание ДНК **3: 21–24**
- Расплавленная глобула **1: 211**
- Растения
 - С₃ **2: 422–425**
 - С₄ **2: 422–425**
 - САМ **2: 426**
 - аквапорины **1: 572, 573**
 - амилопласты **2: 405**
 - брассинолид **1: 509**
 - гликолатный путь **2: 421, 422**
 - глиоксисомы **2: 213, 246–248**
 - гормоны роста **1: 470**
 - десатуразы **2: 459, 461**
 - ДНК **3: 173, 270**
 - иммунные реакции **1: 649**
 - клонирование **1: 469–473**
 - летучие сигнальные вещества **1: 509, 510**
 - мембранные липиды **1: 500**
 - метаболизм липидов **2: 454**
 - метаболизм углеводов **2: 426–433; см. также Цикл Кальвина**
 - интеграция **2: 435–438**
 - митохондриальное дыхание **2: 420**
 - митохондрии, альтернативный путь окисления НАДН **2: 326**
 - органеллы **2: 22, 23, 213, 246, 358, 405**
 - осмотическое давление **1: 87**
 - пентозофосфатный путь **2: 406**
 - пероксисомы **2: 246–248**
 - пластиды **2: 405, 406**
 - пропластиды **2: 405**
 - пулы метаболитов **2: 437**
 - рецептор этилена **1: 647, 648**
 - сигнальные пути **1: 646–649**
 - синтез NADPH **2: 453–455**
 - синтез клеточной стенки **2: 431–433**
 - сосудистые **1: 646**
 - структура клетки **1: 22, 27**
 - фиксация азота **2: 512, 513**
 - фотодыхание **2: 420, 422**
 - фотосинтез, *см.* Фотосинтез
 - хлоропласты, *см.* Хлоропласты
- Раус Ф. Пейтон **3: 146**
- Рауса саркома, вирус **3: 146**
- Рахит **1: 510, 511**
- Рацемическая смесь **1: 36, 37**
- Регулон **3: 245**
- Регуляторные белки **3: 233, 237, 241**
- Регуляторные последовательности **3: 8, 234**
- Регуляторные ферменты **1: 319–322**
- Регуляция экспрессии генов **3: 229–280**
 - SOS-ответ **3: 76, 249**
- ТАТА-связывающий белок **3: 118**
- активаторы **3: 232**
- транскрипции **3: 266**
- активирующая последовательность UAS **3: 261**
- антигенные вариации **3: 256**
- аттенуация транскрипции **3: 245–249**
- богатый глутамином домен **3: 265**
- богатый пролином активационный домен **3: 266**
- в бактериях **3: 243–256**
- в развитии **3: 271–280**
- в эукариотах **3: 257–280**
- вторичные мессенджеры **3: 252, 268**
- гормональная **1: 619, 621; 3: 266–268**
- ДНК-связывающие домены **3: 237**
- индукторы **3: 235**
- индукция **3: 230, 236**
- каталитическая репрессия **3: 244**
- кислый активирующий домен **3: 265**
- коактиваторы **3: 262**
- медиатор **3: 262**
- нарушение в опухолевых клетках **2: 81–84**
- операторы **3: 232**
- опероны, *см.* Опероны
- отрицательная **3: 232**
- переключение типа спаривания у дрожжей **3: 256**
- положительная **3: 232**
- принципы **3: 229–243**
- регулоны **3: 245**
- рекомбинационная **3: 256**
- ремоделирование хроматина **3: 257–260**
- репрессия **3: 231**
- репрессоры **3: 232**
- рибопереключателы **3: 253**
- РНК-интерференция **3: 270**
- сайленсинг **3: 270**
- сайт-специфическая рекомбинация **3: 89, 256**
- строгий ответ **3: 251**
- фазовая вариация **3: 256**
- факторы специфичности **3: 232**
- функция инсулина **1: 619, 621; 2: 149, 150**
- энхансеры **3: 233**
- эфффекторы **3: 232**
- Редактирование РНК **3: 175, 176**

- Рекомбиназа **3: 91–95**
 Рекомбинантная ДНК **1: 434**
 --- в клонировании животных клеток **1: 473–477**
 --- в медицине **1: 479, 480**
 --- в секвенировании геномов **1: 449–461**
 --- в сельском хозяйстве **1: 469–473**
 --- для создания библиотек ДНК **1: 449–451**
 --- методы **1: 434–461**
 Рекомбинационная репарация ДНК **3: 78, 81, 89, 90**
 Рекомбинация ДНК **3: 43, 81**
 --- в репарации **3: 77, 78**
 --- генов иммуноглобулинов **3: 95–98**
 --- гомологичная **3: 81**
 --- и мейоз **3: 82, 84**
 --- кроссинговер **3: 83**
 --- миграция точки ветвления **3: 85**
 --- реакция обмена цепей ДНК **3: 88**
 --- сайт-специфическая **3: 81, 89–94**
 --- сигнальные последовательности **3: 97**
 --- транспозиция **3: 81, 94, 95**
 --- ферменты **3: 85–89**
 Релаксированная ДНК **3: 16–21**
 Реленза (занамивир) **1: 374**
 Ренатурация белков **1: 209**
 Рентгеновская дифракция, метод анализа
 ---- белков **1: 532, 533, 573**
 ---- ДНК **1: 400–402**
 ---- полисахаридов **1: 357, 358**
 Репарация ДНК **1: 446, 670, 671; 3: 66–80**
 --- SOS-ответ **3: 76, 78, 249**
 --- TLS-полимеразы **3: 76, 79**
 --- в димерных хромосомах **3: 93**
 --- ДНК-полимеразы **3: 52, 79, 89**
 --- и рак **3: 79, 80**
 --- корректирующая активность **3: 51–53**
 --- ник-трансляция **3: 53**
 --- ошибочно спаренных оснований **3: 68, 99**
 --- прямая **3: 68, 74**
 --- рекомбинационная **3: 78, 81, 89, 90**
 --- с эксцизией нуклеотидов **3: 68, 73, 74**
 --- с эксцизией оснований **3: 68, 71–73**
 --- функция циклинзависимых протеинкиназ **1: 661–664**
 --- через повреждение **3: 76**
 Репликативная вилка **3: 47, 48**
 --- восстановление **3: 89**
 --- остановка **3: 63, 77, 80, 89**
 Репликативная транспозиция **3: 95**
 Репликативные формы **3: 9**
 Репликатор **3: 64**
 Репликация ДНК: **1: 52; 3: 43–66**
 --- Тег-последовательность **3: 63**
 --- Tus-Тег комплекс **3: 63**
 --- в бактериях **3: 52–63**
 --- в эукариотах **3: 64, 65**
 --- ДНК-полимеразы **3: 52, 61, 64, 65**
 --- ДНК-связывающие белки **3: 58**
 --- инициация **3: 56–58**
 --- корректирующая активность **3: 50**
 --- лидирующая цепь **3: 48, 58–60**
 --- матрица **3: 50**
 --- направленность **3: 48**
 --- ник-трансляция **3: 53**
 --- нуклеофильная атака **3: 49**
 --- отстающая цепь **3: 48, 58–62**
 --- ошибки **3: 50–52**
 --- полуконсервативная **3: 45**
 --- праймер **3: 49, 50, 55**
 --- репликатор **3: 64**
 --- реплисомы **3: 54**
 --- скорость
 ---- в бактериях **3: 50, 52**
 ---- в эукариотах **3: 64**
 --- терминация **3: 62, 63**
 --- топоизомеразы **3: 63**
 --- точка начала (ориджин)
 ---- в бактериях **3: 56**
 ---- в эукариотах **3: 64**
 --- точность **3: 50**
 --- удлинение цепи **3: 58**
 --- ферменты **3: 61, 64**
 --- фрагменты Оказаки **3: 48, 59–61, 65**
 --- хеликазы **3: 54, 57–60, 64**
 --- через повреждение **3: 76**
 --- эволюционное значение **1: 54, 55**
 Репликация РНК **3: 144**
 --- интроны **3: 122, 124, 125**
 --- обратная транскриптаза **3: 144–146**
 --- ретротранспозоны **3: 148**
 --- РНК-репликаза **3: 151**
 --- саморепликация **1: 56; 3: 152**
 --- теломеразы **3: 149, 152**
 --- хоминг **3: 148**
 --- эволюционное значение **1: 56–58; 3: 152**
 Реплисома **3: 54**
 Репрессия **3: 231**
 --- катаболитная **3: 244**
 Репрессоры **3: 232, 233**
 --- *lac* **3: 235, 236, 244, 245**
 --- *trp* **3: 246–249**
 --- в эукариотах **3: 263, 269, 274**
 --- и SOS-ответ **3: 249, 250**
 --- трансляции **3: 250, 251**
 Респирасомы **2: 320**
 Респонсивные элементы **2: 124**
 Рестрикции–модификации система **1: 435**
 Ретикулоциты, регуляция трансляции **3: 269**
 Ретиналь полностью *транс* **1: 34, 511, 652**
 --- 11-*цис* **1: 34, 511, 652**
 Ретинобластома **1: 670**
 --- pRb **1: 665, 670**
 Ретиновая кислота **1: 511; 3: 267**
 Ретиноидные гормоны **3: 266, 267**
 Ретинол (витамин А) **1: 511**
 Ретровирусы **1: 317; 3: 144**
 --- векторы **1: 473–476**
 --- лекарства **1: 317**
 Ретротранспозоны **3: 148**
 Ретрохроминг **3: 148**
 Реутилизация путь **2: 543, 556**
 Рефума болезнь **2: 250**
 Рецепторные каналы **1: 579, 639**
 Рецепторные киназы **1: 606, 624, 667, 668**
 --- JAK-STAT **1: 624**
 Рецепторные ферменты
 --- гистидинкиназа **1: 645**
 --- гуанилилциклаза **1: 627, 528**
 --- тирозинкиназа **1: 619, 624, 632**
 Рецепторный потенциал **1: 656**
 Рецепторы
 --- ANF **1: 627, 628**
 --- Fas **1: 673**
 --- LRP **2:**
 --- NPY **2: 607**
 --- PYY **2: 607**
 --- Т-клеточный **1: 250**
 --- агонисты **1: 597**
 --- β-адренергические **1: 597, 598**
 --- активируемые пролифераторами пероксисом (PPAR) **2: 612, 613**
 --- антагонисты **1: 597**
 --- в эндцитозе **2: 490; 3: 219**
 --- глицина **1: 579, 639, 640**
 --- гормонов **2: 570, 571; 3: 266, 267**
 --- грелина **2: 614**
 --- гуанилина **1: 627**
 --- десенсibilизация **1: 606**
 --- инсулина **1: 170, 619, 624, 626**
 --- как усилители сигнала **2: 570**
 --- каннабиноидов **1: 622**

- лептина **2: 605, 606, 608, 610**
- ЛППП **2: 490**
- меланокортина **2: 607**
- никотиновые ацетилхолиновые **1: 578, 579**
- обонятельные **1: 656–659**
- родопсин **1: 654, 656**
- семиспиральные **1: 597**
- серпентиновые **1: 597**
- сладкого вкуса **1: 681**
- сопряженные с G-белками **1: 595–610, 650, 658**
- сродство к лигандам **1: 592**
- стероидов **1: 509, 643, 644; 2: 570**
- фактора роста тромбоцитов **1: 624**
- эволюционное значение **1: 658**
- эпидермального фактора роста **1: 595, 624**
- мутации **1: 667**
- эритропоэтина **1: 624, 625**
- этилена **1: 647, 648**
- ядерные **1: 643, 644**
- Решф Леа **2: 468**
- Рибоза **1: 340, 341, 392**
- конформация **1: 393**
- Рибозимы **1: 411; 3: 122, 139–142, 154, 182, 200**
- Рибозо-5-фосфат **2: 108, 109, 438**
- Рибозо-5-фосфатизомераза **2: 412**
- Рибозофосфат-пирофосфокиназа **2: 519**
- Рибонуклеаза **1: 129, 200**
- ренатурация **1: 209**
- Рибонуклеиновая кислота, см. РНК
- Рибонуклеозидмонофосфаты циклические **1: 395**
- Рибонуклеотидредуктаза **2: 550–553**
- Рибонуклеотиды **1: 392–394, 424**
- восстановление **2: 550**
- Рибопереклочатели **3: 253, 254**
- Рибосомная РНК, см. рРНК
- Рибосомные белки **3: 180, 250–252**
- Рибосомы **3: 180**
- бактериальные **3: 180–183**
- белки **3: 250–252**
- как место синтеза белка **3: 180**
- коррекция ошибок **3: 202**
- образование **3: 180, 250**
- открытие **3: 169**
- полисомы **3: 204, 205**
- рецикл **3: 203, 204**
- сайты связывания аминокислот-тРНК (А, Р и Е) **3: 197**
- структура **3: 180**
- субъединицы **3: 180, 181**
- эукариотические **3: 183, 184**
- Риботимидин **1: 393**
- Рибофураноза **1: 393**
- Рибулоза **1: 343**
- Рибулозо-1,5-бисфосфат **2: 406–416**
- Рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа, см. Рубиско
- Рибулозо-5-фосфат **2: 109, 415, 438**
- Рибулозо-5-фосфаткиназа **2: 415, 418**
- Ринальдо Пьеро **2: 295, 296**
- Риске Джон **2: 310**
- Риске железо-серный белок **2: 310, 317**
- Рифампицин **3: 122**
- Рицин **3: 209**
- РНК **1: 33, 53; см. также** Нуклеиновые кислоты
- TUF **3: 157**
- аптамеры **3: 154, 155, 254**
- вирусная, см. Ретровирусы; РНК-вирусы
- вторичная структура **1: 406, 410**
- гидролиз **1: 397**
- интерференция **3: 270**
- каталитические **3: 122, 139–142, 154, 182, 200**
- 5'-кэп **3: 122–124**
- малая **3: 270**
- временная **3: 270**
- интерферирующая **3: 270**
- ядерная **3: 127, 128, 138, 157**
- ядрышковая **3: 135, 136, 157**
- матричная, см. мРНК
- микро **3: 138, 270**
- направляющая **3: 176**
- некодирующая **3: 271**
- нуклеотидный состав **1: 392–395**
- оборот **3: 123**
- паразитарная **3: 155, 156**
- прерибосомная, процессинг **3: 134, 135**
- процессинг **3: 122–143**
- в бактериях **3: 134**
- в эукариотах **3: 122–134**
- миРНК **3: 270**
- мРНК, см. мРНК
- мякРНК **3: 135, 136, 157**
- мяРНК **3: 127, 128, 138, 157**
- поли(А)-«хвост» **3: 130, 142, 156**
- полиаденилатполимераза **3: 130**
- полинуклеотидфосфорилаза **3: 142**
- редактирование **3: 139, 175–177**
- рРНК **3: 134, 135, 183**
- сплайсинг **3: 122, 125**
- расщепление **3: 123, 142**
- редактирование **3: 175, 176**
- репликация, см. Репликация РНК
- рибозимы, см. Рибозимы
- рибосомная, см. рРНК
- саморегулирующаяся **1: 56; 3: 152**
- синтез **3: 106; см. также** Транскрипция
- создание, метод SELEX **3: 154, 155**
- спаривание оснований **1: 399**
- сплайсинг **3: 122–133**
- транскрипты
- первичные **3: 122, 123**
- с неизвестной функцией **3: 156–158**
- сложные **3: 132**
- транспортная, см. тРНК
- трехмерная структура **1: 408–412**
- фосфодиэфирные связи **1: 396**
- цис/транс-механизм регуляции **3: 252–254**
- шпильки **3: 116, 142, 190, 247, 252, 270**
- эволюционная роль **1: 56, 57**
- РНКаза Р **1: 410; 3: 134, 136, 138, 141–143**
- РНК-вирусы **3: 144, 270**
- РНК-ДНК гибриды, денатурация **1: 414**
- РНК-зависимая ДНК-ролимераза **3: 144, 145, 151**
- РНК-зонд **1: 443**
- РНК-полимеразы **3: 117**
- I **3: 117**
- II **3: 117, 261**
- связывание с промотором **3: 117, 119**
- III **3: 117**
- в транскрипции **3: 106–108**
- бактерий **3: 108, 109**
- эукариот **3: 117–122**
- ДНК-зависимая **3: 108**
- ингибиторы **3: 121, 122**
- РНК-зависимая **3: 151**
- связывание с промотором **3: 231**
- факторы специфичности **3: 232**
- РНК-репликаза **3: 151**
- Робертс Ричард **3: 125**
- Родбел Мартин **1: 598, 600**
- Родопсин **1: 651, 652, 655**
- Родопсинкиназа **1: 654**
- Розетки
- гликогена **2: 155**
- целлюлозы **2: 432, 433**
- Розиглитазон (авандия) **2: 470**
- Россмана укладка **2: 52, 163**
- рРНК (рибосомная РНК) **3: 134, 135, 183**
- интроны **3: 139, 140**
- процессинг **3: 133–136**
- синтез **3: 135**

Рубиско **2: 407–410, 417–420**

Рубиско-активаза **2: 410**

Рэкер Эфраим **2: 331**

С

Сазерленд Эрл **2: 160, 165, 166**

Сайт-направленный мутагенез **1: 446**

Сайт-специфическая рекомбинация
3: 81, 89

Сакситоксин **1: 579**

Салициловая кислота **2: 461**

Самнер Джеймс **1: 270**

Самуэльсон Бенгт **1: 508**

Сандхофа болезнь **1: 505**

Саркомер **1: 259, 260**

Саркоплазматический ретикулум
1: 259, 261, 560, 561

Сателлитная ДНК **3: 13**

Саузерн Джереми **1: 454**

Саузерн-блоттинг **1: 454, 455**

Сахара **1: 69, 339, см. также Моносахариды, Полисахариды, Углеводы**

– аминоксахара **1: 346**

– восстанавливающие **1: 347, 354**

– и долихолы **1: 513**

– кислые **1: 346**

– невосстанавливающие **1: 347, 354**

– нуклеотидные **2: 158–161**

– эпимеры **1: 343**

Сахарный диабет, *см. Диабет сахарный*

Сахарный код **1: 371, 372**

Сахароза **1: 23, 68, 69, 87, 275, 371; 2: 94**

– в прорастающих семенах **2: 436, 437**

– синтез **2: 426, 428, 429**

Сахарозо-6-фосфат **2: 428, 429**

Сахарозо-6-фосфатсинтаза **2: 428, 429, 431**

Сахарозо-6-фосфатфосфатаза **2: 428, 429**

Сахарозсинтаза **2: 433**

Сахаронуклеотиды **2: 158, 428**

Свертывание крови

– протеолитическая активация факторов **1: 329**

– рекомбинантные продукты **1: 479**

– роль интегринов **1: 641, 642**

Сверхспирализация ДНК, плотность
3: 16, 19

Свет; *см. также Зрение; Флуоресценция; Фотосинтез*

– как стимул для сигнальной системы растений **1: 646–650**

– плоскополяризованный, вращение
1: 36, 37, 117

– поглощение

– аминокислотами **1: 120**

– ДНК **1: 397, 413**

– закон Ламберта–Бера **1: 121**

– липидными пигментами **1: 514**

– флуоресцентными белками
1: 612–614

Светляки, цикл биоломинесценции
2: 39

Световые реакции **2: 358**

Светопоглощающие комплексы
2: 361

Светособирающие (антенные) пигменты **2: 362, 365**

Светочувствительные нейроны
1: 650

Светящиеся растения **1: 471, 472**

Свободная энергия (*G*) (энергия Гиббса) **1: 44; 2: 13**

– в стабилизации структуры белка
1: 173, 174

– в ферментативном катализе
1: 274, 276, 280

– в фолдинге белка **1: 211, 212**

– гидролиза **2: 16**

– изменение (ΔG) **1: 44, 47, 48; 2: 14–16**

Свободноживущие азотфиксирующие бактерии **2: 510**

Свободные жирные кислоты **1: 488, 489; 2: 229; см. также Жирные кислоты**

Свободные радикалы **2: 20**

– реакции **2: 20–25**

Связь; *см. также Слабые взаимодействия*

– водородная, *см. Водородная связь*

– гликозидная **1: 343**

– N-гликозидная **1: 348**

– O-гликозидная **1: 348**

– расщепление лизоцимом **1: 311, 312**

– дисульфидная **1: 120**

– расщепление **1: 145**

– ковалентная **1: 27**

– C–H **2: 21**

– O–H **1: 75**

– O–P **2: 25, 26**

– расщепление **2: 20, 21**

– нековалентная **1: 27; см. также Слабые взаимодействия**

– пептидная, *см. Пептидная связь*

– расщепление при секвенировании пептидов **1: 145**

– углерода **1: 29, 31, 75; 2: 21–23**

– фосфодиэфирная **1: 396**

– энергия диссоциации **1: 75**

Связывание

– антител **1: 254**

– кооперативность **1: 237, 242**

– субстрата в активном центре фермента **1: 273**

– центры **1: 239, 320, 367**

– энергия **1: 48, 280, 281**

Сдвиг рамки считывания **3: 175**

Сегментации гены **3: 273**

Седогепулозо-1,7-бисфосфат **2: 415**

Седогепулозо-7-фосфат **2: 414, 415**

Секвенатор **1: 145**

Секвенирование

– белков и пептидов **1: 143–148**

– методом масс-спектрометрии
1: 151

– ДНК **1: 420–422, 430**

– автоматическое **1: 421, 422**

– и определение белковой последовательности **1: 148, 152**

– по Сенгеру **1: 144, 420–422**

Секретин **2: 264**

Селектины **1: 373, 374, 549**

Селеноцистеин **1: 123; 3: 191**

Семенники **2: 575**

Семиспиральные рецепторы **1: 597**

Сенгер Фредерик **1: 143, 145, 168, 169, 419**

Сердечная мышца **2: 589, 590**

– изоферменты ЛДГ **2: 140, 141**

Сердечно-сосудистые заболевания

– амилоидозы **1: 215**

– антикоагулянты **1: 479**

– атеросклероз **2: 493–495**

– гликогенозы **2: 159**

– как осложнение диабета **1: 348**

– нитросоединения **1: 628**

– приступы **2: 141, 344, 463**

– роль *транс*-жирных кислот
1: 493, 494

– статины **2: 494**

Серин **1: 120**

– биосинтез **2: 326, 519, 521**

– в активности транспептидазы
1: 314

– в активности химотрипсина **1: 303**

– в гликолатном пути **2: 421, 422**

– в протеогликанах **1: 364**

– в синтезе липидов **2: 472–478**

– расщепление до пирувата **2: 285**

– фосфорилирование **1: 325**

– циклосерин **2: 538**

Серингидроксиметилтрансфераза

2: 285, 288, 421, 423, 519, 554

Сериндегидратаза **2: 285**

- Сериновые протеазы **1: 303**
 Сероводород **1: 79**
 Серотонин **1: 500, 647; 2: 290, 539**
 – рецепторы **1: 579, 608**
 Серповидно-клеточная анемия
1: 246–248
 Сестринские хроматиды **3: 82, 83**
 Сетчатка **1: 650–652, 655**
 – колбочки **1: 651, 652, 655**
 – палочки **1: 651, 652**
 Сиалоадгезин **1: 376**
 Сиаловая кислота **1: 347**
 — в ганглиозидах **1: 502, 503, 531**
 Сигнал-распознающая частица
 (SRP) **3: 211, 212**
 Сигнальная последовательность
3: 131, 206, 210–212
 — бактериальных белков **3: 217, 218**
 — инсулина **2: 572, 573**
 — ядерных белков **3: 216**
 Сигнальные белки **1: 629–632**
 Сигнальные системы **1: 591–672**
 — в микроорганизмах **1: 644, 645**
 — в нейроэндокринной системе
2: 566
 — в протеолизе **3: 221**
 — в растениях **1: 509; 646–650;**
2: 463
 — в регуляции генов эукариот **3: 266**
 — в регуляции клеточного цикла
1: 660–665
 — гормональные **2: 566, 570, 571**
 — гормональные каскады **2: 570**
 — зрение, обоняние и вкус
1: 650–659
 — ионные каналы **1: 633**
 — кавеолы **1: 632**
 — лиганд-рецепторные взаимодей-
 ствия **1: 592–594**
 — механизмы **1: 595, 596**
 — рафты **1: 632**
 — роль липидов **1: 506–514**
 — роль углеводов **1: 33, 363, 375**
 — роль фосфатидилинозита **1: 622;**
2: 507
 — роль эйкозаноидов **2: 508**
 — стероидные гормоны **1: 643, 644**
 — ферментативные каскады **1: 592**
 — функция инсулина **2: 149, 151**
 — функция лептина **2: 606, 609, 610**
 Силденафил (виагра) **1: 628**
 Симбиоз
 — в фиксации азота **2: 513**
 — в эволюции митохондрий **2: 352**
 — в эволюции хлоропластов **2: 386**
 Симбионты **2: 6, 510**
 Симвастатин (зокор) **2: 494**
 Симметричная модель, см. Модель
 Моно–Уаймена–Шанже
 Симметрия в белках
 — вращательная (поворотная)
1: 206, 207
 — икосаэдрическая **1: 207**
 — спиральная (винтовая) **1: 207**
 Симпорт **1: 558**
 — Na⁺/глюкоза **1: 569, 570**
 Синапс
 — передача сигнала **1: 635, 636**
 — слияние мембран **1: 548**
 Синдекан **1: 364, 365**
 Синдром X (метаболический син-
 дром) **2: 615**
 Синий флуоресцентный белок
 (BFP) **1: 613–615**
 Синтаза **2: 197**
 — NO **2: 576**
 — жирных кислот **2: 150, 447–453**
 Синтения **1: 462**
 Синтетаза **2: 197**
 α-Синуклеин **1: 217**
 Системная биология **1: 462**
 Ситостерол **2: 433**
 Сквален **2: 480–484**
 Сквален-2,3-эпоксид **2: 483, 484**
 Скваленмонооксигеназа **2: 483, 484**
 Скользящий зажим **3: 60, 61**
 Скорость реакции
 — константа (*k*) **1: 229, 277**
 — лимитирующая стадия **1: 287, 290,**
291
 — уравнение **1: 277, 292**
 Скоу Йенс **1: 562**
 Скрамблаза **1: 540, 541**
 Скрепи (почесуха) **1: 217**
 Скэтчарда анализ **1: 592–594**
 Слабые взаимодействия **1: 73–84**
 — в стабилизации белков **1: 172,**
173, 210
 — в структуре полисахаридов **1: 356**
 — между ферментом и субстратом
1: 277, 279, 280, 282
 Слабые кислоты **1: 93–96**
 — в составе буферов **1: 98**
 Слабые основания **1: 93–96**
 Слай Уильям **2: 295**
 Следовые элементы **1: 29**
 Сложноэфирная конденсация Кляй-
 зена **2: 22, 23**
 β-Слой **1: 181**
 — в крупных глобулярных белках
1: 201
 — скрученные **1: 201**
 Слэк Роджер **2: 424**
 Смешанное ингибирование **1: 295–298**
 Смит Хамилтон **1: 436**
 Соленоидная спираль **3: 25, 26**
 Солнечная энергия **2: 357–363**
 Сольватная оболочка **1: 173**
 Соматостатин **2: 572, 595**
 Сопряженные с G-белками рецептор-
 ные киназы (GRK) **1: 606, 607**
 Сорафениб (нексавар) **1: 669**
 Сорбоза **1: 343**
 Сосудистые растения **1: 32, 646**
 Спаривание оснований
 — аномалии **3: 51, 68**
 — ДНК **1: 9, 402**
 — ДНК–РНК **1: 409**
 — кодонов и антикодонов **3: 174**
 — при ДНК-белковых взаимодей-
 ствиях **3: 237, 238**
 — при репликации **3: 51**
 — РНК–РНК **3: 139**
 — тРНК **3: 185**
 Спектрин **1: 542, 543**
 Спектрофотометрия **1: 121**
 Спермацетовое масло **1: 493**
 Спермидин **2: 540, 542, 543**
 Спермин **2: 540, 542, 543**
 Специфический кислотно-основной
 катализ **1: 284**
 Специфичности константа (*k_{cat}/K_M*)
1: 292
 СПИД, см. Вирус иммунодефицита
 человека
 Спираль
 — α **1: 177, 178, 200**
 — актина **1: 258**
 — в мембранных белках **1: 531–533,**
561, 564–568, 572
 — в полисахаридах **1: 354, 358**
 — в трансмембранных каналах **1: 552,**
553, 576
 — двойная ДНК **1: 52, 399–402**
 — α-кератина **1: 185, 186**
 — миоглобина **1: 194, 195**
 — миозина **1: 257**
 — РНК **1: 409, 410**
 — родопсина **1: 652**
 — суперскрученная ДНК **1: 186**
 — в транскрипции **3: 107**
 — варианты **1: 404, 405**
 — раскручивание **1: 413**
 — тройная коллагена **1: 187, 188, 190**
 Спираль–петля–спираль мотив
1: 616; 3: 242
 Спираль–поворот–спираль мотив
3: 239, 240
 Спирты
 — в экстракции липидов **1: 515**
 — и полуацетали **1: 343, 344**

- и полукетали **1: 343, 344**
 - ферментация **2: 69, 93, 94**
 - Сплайсинг **3: 122–133**
 - Сплайсосома **3: 127**
 - Сплайсосомные интроны **3: 127**
 - Спудич Джеймс **1: 267**
 - Сравнительная геномика **1: 462, 467**
 - Сталь Франклин **3:**
 - Стандартное изменение свободной энергии (ΔG°) **1: 274; 2: 15**
 - аддитивность **2: 18, 19**
 - гидролиза АТФ **2: 29**
 - гликолиза **2: 70, 98**
 - зависимость от концентрации **2: 17**
 - переноса электронов **2: 322**
 - расчет **2: 16**
 - связь с константой равновесия **1: 276; 2: 14, 15**
 - Стандартные приведенные параметры **2: 15**
 - Стандартные условия **2: 15**
 - Стандартный восстановительный потенциал (E°) **2: 47, 48**
 - Старение
 - и митохондриальная ДНК **2: 346**
 - и теломеры **3: 151**
 - Стартовый кодон **3: 195, 196**
 - Статины **2: 493, 494**
 - Стационарная кинетика **1: 287–294**
 - Стационарное состояние **1: 287**
 - клеточного роста **2: 123**
 - Стеарат **2: 457, 458**
 - Стеариновая кислота **1: 490**
 - Стекинговые взаимодействия **1: 398, 409, 413**
 - при репликации **3: 50**
 - Стенокардия, прием вазодилататоров **1: 628**
 - Стереизомеры **1: 33–40**
 - аминокислот **1: 115–118**
 - липидов **1: 497**
 - сахаров **1: 340–344**
 - Стерины **1: 504**
 - в мембранах **1: 496**
 - как липидные якоря **1: 527, 532, 545**
 - Стероидные гормоны **1: 509**
 - регуляция транскрипции **1: 643**
 - роль митохондрий **2: 348**
 - синтез **2: 495, 574**
 - Стероиды **1: 509**
 - синтез **2: 480–485**
 - Стоп-кодны **3: 170**
 - Стрептомицин **3: 209**
 - Стресс
 - окислительный **2: 324**
 - и малярия **2: 107**
 - функция адреналина **2: 602**
 - функция кортизола **2: 602**
 - Строма **2: 359**
 - Стронг Фрэнк **2: 53**
 - Субстрат **1: 226**
 - инсулинового рецептора **1: 624**
 - IRS-1 **1: 619, 622; 2: 170**
 - IRS-2 **2: 610**
 - туннелирование **2: 187**
 - Субстратный цикл **2: 140**
 - Судебная медицина, анализ ДНК **1: 454, 455**
 - Суицидный ингибитор **1: 298**
 - Сукцинат **2: 188, 189**
 - в глиоксилатном цикле **2: 212**
 - окисление до фумарата **2: 198**
 - Сукцинатдегидрогеназа **2: 198, 211**
 - Сукцинаттиокиназа **2: 196, 197**
 - Сукцинил-СоА
 - в распаде аминокислот **2: 279**
 - превращение в сукцинат **2: 196**
 - Сукцинил-СоА-синтетаза, см. Сукцинаттиокиназа
 - Сульфатирование, в протеогликанах **1: 360, 361, 364, 365**
 - Сульфодезокси- α -D-глюкопиранозидиацилглицерин **1: 499, 500**
 - Сульфолипиды **1: 496, 500**
 - Сульфонилмочевина **2: 597, 617**
 - Сунитиниб (сугент) **1: 669**
 - Супероксиддисмутаза **2: 326**
 - Супероксидный радикал **2: 106, 316**
 - Суперспираль
 - ДНК, см. ДНК, сверхспирализация
 - α -кератина **1: 185, 186**
 - коллагена **1: 187, 188**
 - Супрессорная тРНК **3: 203**
 - Сугент (сунитиниб) **1: 669**
 - Сфинганин **2: 476, 478**
 - Сфингозин **1: 501, 502**
 - Сфинголипиды **1: 496, 501, 503**
 - расщепление **1: 503, 505**
 - синтез **2: 478**
 - Сфингомиелин **1: 502, 505, 506; 2: 476**
 - распределение в мембране **1: 528–546**
 - Сфингомиелиназа **1: 505**
 - Сывороточный альбумин **2: 229, 230, 592**
 - Сывороточный амилоид А **1: 215**
- Т**
- Табачной мозаики вирус **1: 207**
 - Тагатаза **1: 342**
 - Талоза **1: 342**
 - Тамифлю (осельгамивир) **1: 374**
 - Тамоксифен **1: 644**
 - Тандемная масс-спектрометрия **1: 150, 151**
 - Таруи болезнь **2: 159**
 - Тарцева (эрлотиниб) **1: 669**
 - Таурохолевая кислота **1: 506**
 - Тейтем Эдвард Л. **2: 193; 3: 8**
 - Теломераза **3: 149–151**
 - Теломеры **3: 14, 15, 149–151**
 - Темин Говард **3: 144, 145**
 - Температура абсолютная, размерность **2: 13**
 - Температура кипения
 - воды **1: 74**
 - некоторых растворителей **1: 74, 76**
 - Тепло, образование см. Термогенез
 - Теплового шока белки
 - в фолдинге **1: 167, 212**
 - промоторы генов **3: 115, 232**
 - Теплота испарения **1: 74**
 - воды **1: 74, 76**
 - Терминальная трансфераза **1: 435**
 - Терминальный комплекс, в целлюлозе **2: 432**
 - Терминаторы транскрипции **3: 116, 247–249**
 - Терминация транскрипции
 - р-зависимая **3: 117**
 - р-независимая **3: 116, 142**
 - Термиты **1: 355**
 - Термогенез **2: 325, 586**
 - в митохондриях **2: 348**
 - сократительный **2: 589**
 - Термогенин **2: 348, 586**
 - Термодинамика
 - второй закон **1: 551; 2: 12**
 - и биоэнергетика **2: 12–19**
 - первый закон **1: 41; 2: 12**
 - предотвращение рассеивания энергии **2: 371**
 - Тест на толерантность к глюкозе **2: 604**
 - Тестостерон **1: 509; 2: 495, 575**
 - Тетрагидробиоптерин **2: 284, 292**
 - в реакции фенилаланин-гидроксилазы **2: 291**
 - Тетрагидроканнабинол **1: 622**
 - Тетрагидрофолат **2: 281, 282, 517, 554**
 - связывание с ферментом **1: 278**
 - Тетрадекановая кислота **1: 488**
 - Тетракозановая кислота **1: 488**
 - Тетрануклеотидная гипотеза, опровержение **1: 432**
 - Тетраплексная ДНК **1: 406, 407**
 - Тетрациклины **3: 208, 209**
 - Тетродотоксин **1: 640**

- Тетрозы **1: 341**
 Тея–Сакса болезнь **1: 505**
 Тиазолидинионы **2: 469, 470**
 Тиаминпирофосфат **2: 93, 112, 183**
 – в цикле Кальвина **2: 413**
 Тилакоиды **2: 358, 359**
 – поток протонов и электронов
2: 367–385
 Тимидилат, биосинтез **2: 554, 558, 559**
 Тимидилатсинтаза **2: 554, 559**
 Тимин **1: 392**
 – эволюционное значение **1: 416, 417**
 Тиолаза **2: 235, 252, 253, 480**
 Тиоредоксин **2: 419, 550, 551**
 Тиоредоксинредуктаза **2: 419, 550, 551**
 4-Теоуридин **1: 395**
 Тиоэферы **2: 34, 183**
 – свободная энергия гидролиза **2: 35**
 Типирование ДНК **1: 454–456**
 Тиреоглобулин **2: 575**
 Тиреоидные гормоны **2: 571, 575**
 Тиреотропин-высвобождающий
 гормон **2: 567**
 Тиреотропный гормон (ТТГ) **1: 130**
 Тирозин **1: 118; 2: 280**
 – биосинтез **2: 523–529**
 – в мембранных белках **1: 535, 536**
 – в синтезе гормонов **2: 574, 575**
 – поглощение света **1: 120**
 – расщепление **2: 280**
 – фосфорилированный **1: 608**
 –– в регуляции клеточного цикла
1: 662
 Тирозиназа **2: 287**
 Тирозинкиназы
 – как мишени для противоопухоле-
 вой терапии **1: 667–669; 2: 81, 82**
 – растворимые **1: 624, 625**
 – рецепторные **1: 595, 619–624**
 Тирозиновый радикал **2: 551–553**
 Тироксин (Т4) **2: 575**
 Титин **1: 130, 260**
 Титрование
 – аминокислот **1: 123–126**
 – кривая **1: 94**
 – пептидов **1: 128, 129**
 – слабых кислот **1: 95, 97**
 – уравнение Хендерсона–Хассель-
 баха **1: 98**
 Токоферолы **1: 512**
 Токсины **1: 579, 581, 640**
 – ингибирование трансляции
3: 207–209
 Толбутамид **2: 597**
 Толстые филаменты **1: 258**
 Тонкие филаменты **1: 258**
 Тонкий кишечник, всасывание жи-
 ров **2: 226, 227**
 Тонкослойная хроматография **1: 169, 515–517**
 Топоизомеразы **3: 23, 54, 61, 63**
 – ингибиторы **3: 24, 35**
 Топоизомеры **3: 20, 21**
 Топология **3: 16, 18**
 Топотекал **3: 25**
 Торсионный угол **1: 176, 177, 357**
 Точка начала репликации (*oriC*)
3: 44, 46, 48, 56, 58, 64, 65
 Трансальдолаза **2: 111**
 – в цикле Кальвина **2: 412, 413**
 Трансаминаза **2: 266**
 Трансаминирование **2: 266**
 Трансгенная мышь **1: 477**
 Трансдезаминирование **2: 270**
 Трансдукцин **1: 652, 653**
 Транс-жирные кислоты **1: 493, 494**
 Транскетолаза **2: 111, 112**
 – в цикле Кальвина **2: 412–415**
 – дефект при синдроме Вернике–
 Корсакова **2: 112**
 Транс-конфигурация пептидной
 связи **1: 176, 182**
 Транскрипт
 – первичный **3: 122, 123**
 – сложный **3: 132**
 – сплайсинг **3: 122–133**
 Транскриптом **2: 126; 3: 106, 156–158**
 Транскрипционные факторы **2: 124; 150–152; 3: 120**
 –– основные **3: 120**
 Транскрипционный профиль **1: 466**
 Транскрипционный пузырьк
3: 106–108
 Транскрипция **1: 408, 409; 3: 105**
 – активаторы **3: 232**
 – аттенуация **3: 245–249**
 – ингибирование лекарствами **3: 121, 122**
 – инициация **3: 112–115, 232–234**
 – интронов **3: 131**
 – корректирующая активность **3: 110**
 – обратная **1: 317; 3: 144**
 – промоторы **3: 110, 112, 260**
 – регуляция
 –– в бактериях **3: 234–236**
 –– в эукариотах **3: 257–263, 271**
 –– отрицательная **3: 232, 233, 235**
 –– положительная **3: 232, 233**
 – репрессоры **3: 232**
 –– стероидными гормонами **1: 643**
 – сопряжение с трансляцией **3: 204, 205**
 – терминация **3: 116**
 Транслокация
 – в перемещении белка **3: 212, 218**
 – в синтезе белка **3: 200, 201**
 Трансляция **3: 179–181**
 – регуляция **3: 250, 268**
 – репрессия **3: 250, 268**
 – сдвиг рамки **3: 175**
 – сопряжение с транскрипцией
3: 204, 205
 – стадии **3: 179, 181**
 Транспептидаза **1: 314, 315**
 Транспозиция **3: 94**
 – прямая **3: 95**
 – репликативная **3: 95**
 Транспозоны **1: 460; 3: 94**
 – инсерционные последовательности
3: 95
 – сложные **3: 94**
 Транспортёры **1: 552, 553; см. также**
 Ионные каналы; Переносчики
 Транспортная РНК, см. тРНК
 Транспортные везикулы **1: 375**
 –– доставка белков **3: 214, 215**
 –– доставка липидов **2: 265**
 Трансферрин **2: 193**
 – рецепторы **2: 193, 194**
 Трансформация, при клонировании
1: 439, 449
 Трансфосфорилирование, в нуклео-
 тидях **2: 40**
 Трастузумаб (герцептин) **1: 669**
 Трегалоза **1: 351**
 Треоза **1: 342**
 Треонин **1: 114, 120; 2: 523**
 – биосинтез **2: 523**
 – превращение в пропионил-СоА
2: 295
 – превращение в сукцинил-СоА
2: 294
 – расщепление до пирувата **2: 285, 288**
 – фосфорилированный **1: 632**
 Треониндегидрогеназа **1: 291**
 – ингибирование **1: 321; 2: 531**
 Треонинсинтаза **2: 524, 525**
 Триацилглицеринлипаза **2: 586**
 Триацилглицерины **1: 491, 492; 2: 584; см. также** Жирные кислоты
 – в прорастающих семенах **2: 247**
 – всасывание **2: 226–228**
 – гормональная мобилизация **2: 228, 229**
 – запасаение в адипоцитах **2: 585, 586**
 – накопление при ожирении
2: 615–617
 – реутилизация **2: 466, 467**
 – синтез **2: 464–469**

- содержание в организме **2: 600**
 - транспорт **2: 485–487**
 - цикл **2: 467**
 - Триглицериды, см. Триацилглицерины
 - Триодтиронин (Т3) **2: 575**
 - Трикарбоновых кислот цикл (цикл лимонной кислоты, цикл Кребса) **2: 181**
 - Триметоприм **2: 558, 560**
 - Триозокиназа **2: 89**
 - Триозофосфатизомеразы **1: 281; 2: 58, 75, 89, 112, 195, 411**
 - Триозофосфаты
 - антипорт **2: 416–418**
 - в цикле Кальвина **2: 406–416**
 - взаимные превращения **2: 412**
 - превращение в сахарозу/крахмал **2: 426–430**
 - синтез **2: 410–415**
 - Триозы **1: 340, 341**
 - Трипаносомоз (африканская сонная болезнь) **1: 541, 542**
 - Триплетный код **3: 167–171**
 - Трипсин **1: 102, 146, 257, 272; 2: 264**
 - ингибитор **1: 328; 2: 264**
 - синтез **1: 328, 329**
 - фрагменты **1: 147**
 - Трипсиноген **1: 328, 329; 2: 264**
 - Триптофан **1: 69, 116, 118**
 - биосинтез **2: 523, 527, 528**
 - в гидрофобных взаимодействиях **1: 377**
 - в мембранных белках **1: 535, 536**
 - поглощение света **1: 120**
 - расщепление до ацетил-СоА **2: 288–290**
 - расщепление до пирувата **2: 285**
 - Триптофансинтаза **2: 527, 528**
 - Трисахаридный мостик **1: 364–366**
 - Трихроматы **1: 656**
 - тРНК (транспортная РНК) **1: 391; 3: 136**
 - D-плечо **3: 184**
 - T ψ C-плечо **3: 185**
 - аминокислотное плечо **3: 184**
 - антикодоновое плечо **3: 184**
 - в трансляции **3: 185**
 - минорные основания **1: 395**
 - процессинг **3: 137**
 - спаривание с мРНК **3: 136**
 - структура **1: 411; 3: 184–186**
 - супрессоры **3: 203**
 - Тройная связь углерода **1: 29, 31**
 - Тройная спираль
 - ДНК **1: 407**
 - коллагена **1: 187–192**
 - Тройной комплекс, в двухсубстратной реакции **1: 293, 294**
 - Тромбин **1: 329, 361**
 - Тромбоз
 - протеолиз **1: 329**
 - селектины **1: 373, 374**
 - Тромбоксансинтаза **2: 463**
 - Тромбоксаны **1: 507–509**
 - синтез **2: 461–463**
 - Тромбоциты **2: 592**
 - интегрины **1: 642**
 - фактор активации **1: 499; 2: 476**
 - фактор роста (PDGF) **1: 624**
 - Тропные гормоны **2: 576**
 - Тропоколлаген **1: 188**
 - Тропомиозин **1: 258, 261**
 - Тропонин **1: 258, 261, 614**
 - Тубокурарин **1: 581**
 - Тудикум Йохан **1: 501, 503, 523**
 - Туникамицин **3: 213, 214**
 - Тупые концы **1: 437, 438**
 - Тяжелая цепь
 - иммуноглобулина **1: 251, 252**
 - рекомбинация **3: 97**
 - миозина **1: 257**
 - Тяжелый комбинированный иммунодефицит **1: 475**
- У**
- Уаймен Джеффри **1: 242**
 - Убиквитин **1: 323, 662, 663; 3: 220–222**
 - в протеолизе **3: 221, 222**
 - Убихинон (кофермент Q) **1: 512, 513; 2: 309, 313–318**
 - Убихинон: цитохром-с-оксидоредуктаза **2: 313, 318**
 - Углеводы **1: 339–381; см. также**
 - Дисахариды; Моносахариды; Олигосахариды; Полисахариды
 - анализ **1: 379–381**
 - активация долихолами **1: 513**
 - гликоконъюгаты **1: 363–370**
 - гликолиз **2: 66–84**
 - код сахаров **1: 371**
 - метаболизм **66–112**
 - анаболизм **2: 581**
 - в печени **2: 172, 581, 582**
 - в растениях и бактериях **2: 403–445**
 - катаболизм **2: 581**
 - метаболический контроль **2: 137, 138**
 - при сахарном диабете **2: 84, 85**
 - регуляция **2: 105, 112, 139–152**
 - аллостерическая и гормональная **2: 170–173**
 - на уровне экспрессии генов **2: 149–152**
 - ферменты **2: 124–127**
 - номенклатура **1: 339–343**
 - окисление **1: 347**
 - связывание с лектинами **1: 372–378**
 - синтез, см. также Глюконеогенез
 - С₄-путь **2: 420–426**
 - гликолатный путь **2: 421, 422**
 - интеграция процессов **2: 435–438**
 - крахмала **2: 426–428**
 - пентозофосфатный путь **2: 107–112, 438**
 - пептидогликанов **2: 433–435**
 - сахарозы **2: 428–430**
 - фотодыхание **2: 420, 421**
 - фотосинтез **2: 404–419**
 - целлюлозы **2: 431–433**
 - формулы Фишера **1: 341**
 - химический синтез **1: 381**
 - Углерод
 - аномерный **1: 344**
 - асимметрический **1: 35, 341**
 - окисление **2: 21, 26, 27, 45**
 - Углеродная связь **1: 29–31**
 - гидролиз **2: 32, 33**
 - реакции **2: 20–24**
 - Уилкинс Морис **1: 400, 401**
 - Уитерс Стефен **1: 313**
 - Уксусная кислота **1: 93–95; 2: 116**
 - рK_a **1: 95**
 - в буферной системе **1: 97**
 - кривая титрования **1: 95**
 - Унипорт **1: 558**
 - Уокер Э. Джон **2: 333, 334**
 - Уоррен Дж. Робин **1: 374**
 - Уотсон Джеймс Д. **1: 9, 142, 400–405, 457; 3: 45, 50**
 - Уотсона–Крика правило спаривания оснований **3: 108**
 - Уратоксидаза **2: 556**
 - Урацил **1: 392, 393**
 - дезаминирование цитозина **1: 416**
 - при заболеваниях **2: 554**
 - таутомерные формы **1: 397, 398**
 - Урацил-ДНК-гликозилаза **3: 72**
 - Уреотелические организмы **2: 273**
 - Уридилат **1: 393**
 - Уридилирование **2: 516**
 - Уридилилтрансфераза **2: 515, 516**
 - Уридин **1: 393**
 - Уридин-5'-монофосфат (UMP) **1: 394; 2: 547**
 - Уридиндифосфат (UDP) **2: 89, 435**

Урикогелические организмы **2: 273**
 Уроновая кислота **1: 347**
 — в гликозаминогликанах **1: 360, 361**
 Уротензин II **1: 478**
 Усай Бернардо **2: 160**
 Усиление сигнала **1: 575, 592, 604, 606, 618, 626, 659**

Ф

Фабри болезнь **1: 505**
 Фаг λ, как вектор **1: 438, 440, 441; 3: 92**
 Фагоцитоз **1: 253**
 Фактор роста сосудистого эпителия, рецептор **1: 624, 667**
 Факторы высвобождения (терминации) **3: 202–204**
 Факторы обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) **1: 601**
 Факторы роста **1: 664, 666–668**
 Факторы специфичности **3: 114, 115, 232**
 Фанкони–Бикель болезнь **2: 159**
 Фарадея постоянная **1: 559; 2: 13, 47**
 Фелинга реакция **1: 347, 348**
 Фенилаланин **1: 78, 116, 118; 2: 291**
 — биосинтез **2: 518, 523, 528, 529**
 — катаболизм **2: 280, 288**
 — тРНК **1: 411**
 Фенилаланингидроксилаза **2: 287, 291, 528**
 Фенилацетат **2: 279, 291, 292**
 Фенилацетил-СоА **2: 279**
 Фенилацетилглутамин **2: 279**
 Фенилкетонурия **2: 287, 291**
 — скрининг у новорожденных **2: 292**
 Фенилпируват **2: 291, 292**
 Фенотип **3: 8**
 Феофитин **2: 367–371**
 Феофитин-хиноновая система **2: 367–371**
 Ферментативная кинетика **1: 285**
 — двухсубстратных реакций **1: 293, 294**
 — для регуляторных ферментов **1: 319–322**
 — зависимость от pH **1: 299, 303**
 — константа Михаэлиса **1: 288, 290**
 — лимитирующая стадия **1: 275**
 — максимальная скорость **1: 285, 290**
 — начальная скорость **1: 285, 289**
 — переходное состояние **1: 274, 306, 307**

— предстационарная **1: 287, 294, 302**
 — стационарная **1: 287, 294**
 — уравнение скорости реакции **1: 276, 287**
 — уравнение Михаэлиса–Ментен **1: 288**
 — преобразования **1: 289, 290**
 Ферментативные реакции **1: 300–330**
 — второго порядка **1: 229**
 — двухсубстратные **1: 293**
 — ингибирование **1: 295–299; см. также Ингибиторы ферментов**
 — по принципу обратной связи **1: 321**
 — суицидными ингибиторами **1: 298**
 — интермедиаты **1: 275**
 — константа диссоциации **1: 290**
 — константа скорости **1: 276**
 — координата реакции **1: 274**
 — лимитирующая стадия **1: 275**
 — механизм
 — гексокиназы **1: 308, 309**
 — енолазы **1: 309, 310**
 — катализа ионами металлов **1: 284, 309, 310**
 — кислотно-основного катализа **1: 283, 284**
 — ковалентного катализа **1: 284**
 — лизоцима **1: 310–313**
 — пинг-понг **1: 293, 294**
 — Филлипса, для лизоцима **1: 312, 313**
 — химотрипсина **1: 301–305**
 — основное состояние **1: 274**
 — первого порядка **1: 229**
 — переходное состояние **1: 274**
 — предстационарное состояние **1: 287, 294**
 — принципы катализа **1: 277–281**
 — равновесие **1: 276**
 — константа **1: 276**
 — разрушение сольватной оболочки **1: 282**
 — скорость **1: 274**
 — максимальная **1: 286**
 — начальная **1: 286**
 — уменьшение энтропии **1: 282**
 — стационарное состояние **1: 287**
 — уравнение скорости **1: 276**
 — энергия активации **1: 274, 275, 280**
 — энергия связывания **1: 277, 280**
 Ферментативный каскад **1: 592**
 — MAPK **1: 619–621**
 — в растениях **1: 648, 649**

Ферментация (брожение) **2: 66, 96**
 — в пивоварении **2: 93**
 — молочнокислое брожение **2: 69, 91, 581**
 — полезные продукты **2: 96**
 — производство спирта **2: 65, 69, 93**
 Фермент-субстратный комплекс **1: 278, 280, 285–287**
 — индуцированное соответствие **1: 282**
 — ковалентные/нековалентные взаимодействия **1: 277**
 Ферменты **1: 270–330**
 — активность **1: 140; 2: 125**
 — удельная **1: 140**
 — активный (каталитический) центр **1: 226, 273**
 — комплементарность переходному состоянию **1: 278, 279, 306, 307**
 — аллостерические **1: 319–323**
 — апоферменты **1: 272**
 — зимогены **1: 328**
 — классификация **1: 272**
 — кофакторы **1: 271**
 — коферменты **1: 271**
 — коэффициент управления **2: 135, 136**
 — нитрогеназного комплекса **2: 510, 511**
 — очистка **1: 132–140**
 — печени **2: 579**
 — пируватдегидрогеназного комплекса **2: 183, 184**
 — протестические группы **1: 271**
 — протеолитические, активация **1: 328, 329**
 — проферменты **1: 328**
 — регуляторные **1: 319**
 — аллостерические **1: 319–323**
 — гомотропные **1: 320**
 — регуляция **1: 319–330**
 — и состояние равновесия **2: 128**
 — ковалентная модификация **1: 323–328**
 — на уровне экспрессии генов **2: 124–126**
 — протеолитическое расщепление **1: 328, 329**
 — фосфорилирование **1: 322–328**
 — рестрикционные, см. Эндонуклеазы рестрикции
 — рецепторные, см. Рецепторные ферменты
 — специфичность **1: 281**
 — коэффициент **1: 292**
 — субстраты **1: 226, 273**

- холоферменты **1: 271**
- число оборотов **1: 291**
- эластичность **2: 134**
- Ферредоксин Fd **2: 48, 311, 374, 375, 419**
- Ферредоксин-NADP⁺-оксидоредуктаза **2: 374, 378**
- Ферредоксин-тиоредоксинредуктаза **2: 419**
- Ферритин **2: 193, 194**
- Фибриллярные белки **1: 185–192**
 - α-кератин **1: 185–187**
 - коллаген **1: 187–192**
 - фиброин **1: 192**
- Фибрин **1: 192**
- Фибриноген **1: 329, 512**
- Фибробласты, фактор роста (ФРФ) **1: 361, 365, 624**
- Фиброин шелка **1: 192**
- Фибронектин, и протеогликаны **1: 359, 367, 549**
- Фикобилин **2: 361, 362**
- Фикобилипротеин **2: 361**
- Фикобилисома **2: 364**
- Фикоцианин **2: 361–364**
- Фикоэритробилин **2: 361–364**
- Фиксация азота **2: 6, 510**
 - бактерией *Azotobacter vinelandii* **2: 512**
- Фиксация углерода **2: 358, 406, 407;**
см. также Диоксид углерода, ассимиляция
- Филаменты цитоскелета **1: 24**
- Филлипс Дэвид **1: 310**
- Филлипса механизм **1: 312, 313**
- Филлохинон (витамин K₁) **1: 512; 2: 374, 375**
- Фитановая кислота, α-окисление **2: 250**
- Фитол **2: 361**
- Фишер Эмиль **1: 117, 225, 278**
- Фишера проекционные формулы **1: 341, 344**
- Флавинадениндинуклеотид, *см.* FAD
- Флавинмоноклеотид, *см.* FMN
- Флавиновые нуклеотиды **2: 48, 54, 55, 308**
- Флаводоксин **2: 511, 512**
- Флавопиридол **1: 669**
- Флавопротеины **2: 55, 308, 314**
 - электронпереносящий (ЭПФ) **2: 314**
- Флиппазы **1: 540, 541**
- Флип-флоп диффузия **1: 540**
- Флоппазы **1: 540, 541**
- Флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET) **1: 609, 613–615**
- Флуоресценция **2: 361**
 - FRAP **1: 541, 542**
 - FRET **1: 613–615**
- Фолат
 - H₄, *см.* Тетрагидрофолат
 - метаболизм, в химиотерапии **2: 558**
 - недостаточность **2: 284**
- Фолдинг белка **1: 200–215; 3: 179, 180**
 - *in vitro* **1: 440, 442**
 - белковые домены **1: 200**
 - мотивы **1: 200–202**
 - нарушения **1: 215–218**
 - парадокс Левинтала **1: 210**
 - правила **1: 201**
 - расплавленная глобула **1: 211**
 - роль дисульфидизомеразы **1: 213**
 - супервторичная структура **1: 200**
 - термодинамика **1: 211, 212**
 - шаперонины **1: 212–214**
 - шапероны **1: 212–214**
- Форболовые эфиры **1: 611**
- Форбса (Кори) болезнь **2: 159**
- Формальдегид **2: 45**
- N-Формилметионин **3: 195, 196, 200**
 - посттрансляционные модификации **3: 206**
- N-Формилметионин-tРНК **3: 195, 196**
- Фосфагены **2: 42**
- Фосфат
 - в качестве буфера **1: 93, 95, 97**
 - в нуклеотидах **1: 392, 394**
 - неорганический
 - в окислении глюкозы **1: 46**
 - в синтезе крахмала **2: 427–430**
 - в фотосинтезе **2: 415–417**
- Фосфатаза **2: 197**
 - фосфорилазы α (фосфопротеин-фосфатаза-1) **2: 127, 167, 168, 170**
- Фосфатидилглицерин **1: 527, 533; 2: 472**
- Фосфатидилинозит **1: 507, 527, 530; 2: 472, 474**
- Фосфатидилинозит-3,4,5-трифосфат **1: 507, 622; 2: 170**
- Фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат **1: 507, 609, 622; 2: 170**
- Фосфатидилинозиткиназа **2: 170, 472**
- Фосфатидилинозитная система **1: 610**
- Фосфатидилсерин **1: 497, 530, 541; 2: 475**
- Фосфатидилсеринсинтаза **2: 475**
- Фосфатидилхолин (лецитин) **1: 78, 497, 502, 527; 2: 461, 472, 474, 475, 478**
- Фосфатидилэтаноламин **1: 497, 530; 2: 472, 474–476**
- Фосфатидная кислота **1: 497; 2: 465, 471**
 - фосфатаза **2: 465**
- Фосфатная связь, энергетическое содержание **2: 35, 36**
- Фосфаттрансфераза **2: 159, 340**
- Фосфоангидридная связь **1: 44, 45, 104, 425**
- Фосфогексоизомеразы **2: 24, 430**
- 2-Фосфогликолат **2: 420–422**
- 2-Фосфоглицерат **1: 309, 310; 2: 78, 79, 98, 104**
- 3-Фосфоглицерат **2: 33, 76, 78, 98, 104**
 - в фиксации углерода **2: 406–418**
- 3-Фосфоглицераткиназа **2: 76, 411**
- Фосфоглицератмутаза **2: 78, 128**
- Фосфоглицериды, *см.* Глицерофосфолипиды
- 3-Фосфоглицериновая кислота **2: 32, 33**
- Фосфоглюкоизомеразы (глюкозо-фосфатизомеразы) **2: 72, 111**
- Фосфоглюкомутаза **2: 87, 157**
- Фосфоглюконатдегидрогеназа **2: 109**
- Фосфоглюконатный путь, *см.* Пентозофосфатный путь
- Фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов **1: 606**
 - и зрение **1: 602, 653, 654**
- Фосфодиэфирная связь, в нуклеиновых кислотах **1: 396**
- Фосфоенолпируват (ФЕП) **1: 309, 310; 2: 79, 100**
 - в гликолизном цикле растений **2: 211, 212**
 - в глицеронеогенезе **2: 468**
 - в глюконеогенезе **2: 98, 104**
 - в переносе фосфорильных групп **2: 36, 37, 79**
 - гидролиз **2: 32**
 - образование
 - из оксалоацетата **2: 212**
 - из пирувата **2: 100**
 - из 2-фосфоглицерата **2: 79**
- Фосфоенолпируваткарбоксикиназа (ФЕП-карбоксикиназа) **2: 101**
- Фосфоенолпируваткарбоксилаза (ФЕП-карбоксилаза) **2: 424**
- Фосфоинозитид-3-киназа **1: 616, 622**

- Фосфокреатин **2: 536, 537**
 – в мышцах **2: 588, 589**
- Фосфолипаза **1: 504, 517**
 – А: **1: 503, 504, 536; 2: 461**
 – С **1: 504, 507, 530, 609, 659**
- Фосфолипиды **1: 496**
 – в составе мембран **1: 527, 528, 530, 533, 534**
 – группы головки **2: 470, 471, 473**
 – двойной слой **1: 527, 528**
 – инозита **1: 507**
 – методы анализа **1: 517**
 – переносчики **1: 540, 541**
 – расщепление в лизосомах **1: 503**
 – синтез **2: 470, 472, 476**
 – транспорт **2: 485, 486**
- Фосфоманноизомераза **2: 90**
- Фосфопантетеин **2: 450–452**
- Фосфопентозоизомераза **2: 109**
- Фосфопорин Е **1: 536**
- Фосфопротеинфосфатаза
 – 1 (фосфатаза фосфорилазы а) **2: 127, 167, 168, 170**
 – 2А **2: 127, 146, 150**
 – в регуляции цикла лимонной кислоты **2: 208, 214**
- Фосфопротеины **1: 131**
- Фосфор, ковалентные связи **2: 25, 26**
- Фосфорамидитный метод синтеза ДНК **1: 422, 423**
- 5-Фосфорибозил-1-пирофосфат **2: 518**
- 5-Фосфорибозиламин **2: 545, 547**
- Фосфорибозилпирофосфат (PRPP) **2: 544**
- Фосфорилаза, *см. также* Гликогенфосфорилаза **1: 325; 2: 165, 166**
 – крахмала **2: 87**
- Фосфорилирование; *см. также* Аутофосфорилирование
 – АТРаз **1: 560–562**
 – аминокислотных остатков **1: 122, 123**
 – ацетил-СоА-карбоксилазы **2: 243**
 – белка ретинобластомы **1: 664, 665**
 – в метаболизме углеводов **1: 347**
 – в передаче сигнала **1: 619–627**
 – сAMP **1: 599, 602–604**
 – сGMP **1: 627**
 – в β-адренергическом пути **1: 606, 607**
 – в бактериях **1: 644–646**
 – в поливалентных адаптерных белках **1: 629–631**
 – в пути IP₃/диацилглицерина **1: 611**
 – в пути JAK-STAT **1: 624, 625**
 – в пути PI-3K-PKB **1: 622, 623**
 – в растениях **1: 644–646**
 – киназой β-адренергического рецептора **1: 606**
 – протеинкиназой А **1: 599, 602–604**
 – рецепторными протеинкиназами **1: 619, 624**
 – в процессинге РНК **3: 143**
 – в регуляции активности ферментов **1: 324, 327, 605**
 – экспрессии **3: 268, 269**
 – в репликации ДНК **3: 64**
 – в сердечной мышце **2: 589, 590**
 – в синтезе сахарозы **2: 428, 429**
 – в транскрипции **3: 120**
 – в ферментативных каскадах **1: 606, 619–626**
 – гликогенфосфорилазы **1: 326**
 – глюкозы **2: 71**
 – консенсусные последовательности **1: 327, 603, 605**
 – множественное **1: 325, 328**
 – обратимость **1: 328**
 – окислительное **2: 78, 305–346**
 – посттрансляционное **3: 206**
 – потенциал (DCp) **2: 30**
 – протонный градиент **2: 382**
 – родопсина **1: 654**
 – субстратное **2: 78**
 – фруктозо-6-фосфата **2: 72, 73**
 – циклинзависимых протеинкиназ **1: 661–663; 3: 64, 120**
- Фосфорилированные соединения, энергия гидролиза **2: 29–33**
- Фосфорильная группа
 – и АТР **2: 25, 26, 35–38, 41**
 – перенос **2: 25, 26**
 – от неорганических полифосфатов **2: 42**
 – от ФЕП **2: 37**
 – функция в гликолизе **2: 71–80**
- Фосфоролит **2: 87, 155, 197**
- Фосфотирозинсвязывающий домен **1: 630**
- Фосфотирозинфосфатазы **1: 632**
- Фосфофруктокиназа
 – 1 (ФФК-1) **2: 72, 73, 99, 103, 430**
 – регуляция **2: 143, 346**
 – 2 (ФФК-2) **2: 146, 429, 430, 611**
- Фотодыхание **2: 420, 422**
- Фотолиазы **2: 55**
 – в репарации ДНК **3: 74, 75**
- Фотолитография **1: 463, 464**
- Фотон **2: 359**
 – энергия **2: 359–370**
- Фотопигменты **1: 655**
 – главные и вспомогательные **2: 362, 363**
- 6,4-Фотопродукт **1: 417, 418**
- Фотосинтез **2: 356–366**
 – С₂-путь **2: 422**
 – P_i-тризофосфатный антипорт **2: 416, 417**
 – ассимиляция СО₂ **2: 404**
 – в С₄-растениях **2: 420, 423, 424**
 – в САМ-растениях **2: 420**
 – восстановительный пентозофосфатный путь **2: 406**
 – гликолатный путь **2: 420–422**
 – и фотофосфорилирование **2: 357**
 – поглощение энергии света хлорофиллом **2: 359–366**
 – световые реакции **2: 358**
 – синтез крахмала **2: 426–428**
 – синтез сахарозы **2: 428–430**
 – спектр действия **2: 362, 364**
 – темновые реакции **2: 358**
 – фиксация углерода **2: 358; см. также** Цикл Кальвина
 – фотодыхание **2: 420**
 – функция АТР **2: 415**
 – функция NADPH **2: 415**
 – эволюция **2: 385–387**
- Фотосистема **2: 365**
 – I/II **2: 367–375**
 – связь с цитохромом *b6f* **2: 376–379**
- Фототрофы **1: 20**
- Фотофосфорилирование **2: 357**
 – в хлоропластах **2: 358, 359**
 – и окислительное фосфорилирование **2: 382**
 – поглощение света **2: 359–365**
 – расщепление воды **2: 379, 380**
 – реакция Хилла **2: 359**
 – синтез АТР **2: 381, 382**
 – стехиометрия **2: 383, 384**
 – хемосмотическая теория **2: 328**
- Фотохимические реакционные центры **2: 365, 366**
 – Fe-S **2: 370–373**
 – бактерий **2: 367, 368**
 – растений **2: 372**
- Фракционирование
 – белков **1: 132**
 – клеток **1: 24, 87**
- Франклин Розалинд **1: 400, 401**
- Фруктоза **1: 340, 341, 343, 344**
- Фруктозо-1,6-бисфосфат **2: 72, 73**
 – в цикле Кальвина **2: 411–413**
 – расщепление **2: 73**
 – регуляция **2: 143, 144**

Фруктозо-1,6-бисфосфатаза **2: 103, 139, 412, 418, 429**
 – активация светом **2: 418, 419**
 Фруктозо-1-фосфат **2: 88, 89**
 Фруктозо-2,6-бисфосфат **2: 144, 146**
 – в синтезе сахарозы **2: 429, 430**
 Фруктозо-2,6-бисфосфатаза **2: 146**
 Фруктозо-6-фосфат **2: 146**
 – в синтезе сахарозы **2: 411, 430**
 – в цикле Кальвина **2: 411, 413**
 Фруктозодифосфатальдолаза (альдолаза) **2: 73**
 Фруктозофосфатальдолаза **2: 89**
 Фруктокиназа **2: 88**
 L-Фтораланин **2: 538**
 Фтордезоксиглюкоза **2: 82, 83, 591**
 Фторурацил **2: 558, 559**

Х

Хансон Ричард **2: 468**
 Хантингтин **1: 217**
 Хантингтона болезнь **1: 484**
 – аномальный фолдинг **1: 215, 217**
 Хартли Б. С. **1: 302**
 Хеликазы **3: 54**
 – в репарации **3: 70, 73, 74**
 – в репликации **3: 54, 55, 57–65**
 Хемосмотическая теория (теория Митчелла) **2: 305, 327–329, 339, 382**
 Хемогетеротрофы **1: 58**
 Хемотаксис, двухкомпонентная передача сигнала **1: 644–646**
 Хемотрофы **1: 20**
 Хендерсона–Хассельбаха уравнение **1: 98, 99**
 Хенселейт Курт **2: 273**
 Херши Альфред **1: 400**
 Херши–Чейза эксперимент **1: 400**
 Хеурса проекционные формулы **1: 344, 345, 351**
 Хилл Арчибальд **1: 239**
 Хилл Роберт **2: 359**
 Хилла график **1: 242**
 Хилла коэффициент **1: 239; 2: 127, 136**
 Хилла реагент **2: 359**
 Хилла уравнение **1: 239**
 Хиломикроны **2: 228, 485–487**
 Химиотерапевтические препараты
 – ингибиторы протеиназ **1: 667, 668**
 – ингибиторы топоизомеразы **3: 24, 25**
 – мишени в биосинтезе нуклеотидов **2: 558–560**
 – транскрипционный профиль **1: 465, 466**
 Химическая реакция
 – механизм **1: 304, 305**
 – отличие от биохимической реакции **2: 27**
 Химические модели молекул
 – СРК **1: 33–35**
 – шаро-стержневая **1: 33, 34**
 – перспективная **1: 33, 34**
 Химические элементы
 – незаменимые **1: 29**
 – следовые (микроэлементы) **1: 29**
 Химический синтез ДНК **1: 643**
 – фосфорамидитный метод **1: 422**
 Химотрипсин **1: 129, 130, 200, 273, 298; 2: 25, 264, 568**
 – каталитическая активность **1: 291, 302**
 – комплементарность переходному состоянию **1: 306**
 – механизм реакции **1: 283, 301–305**
 – синтез **1: 328, 329**
 – структура **1: 301**
 Химотрипсиноген **1: 131, 139; 2: 264**
 Хиральные молекулы **1: 35–38**
 – оптическая активность **1: 117**
 Хиральный центр **1: 35**
 Хитин **1: 356**
 Хитчингс Джордж **2: 557, 560**
 хлДНК (ДНК хлоропластов) **3: 12**
 Хлорамфеникол **3: 209**
 Хлоридно-бикарбонатный обменник **1: 556–558**
 Хлориды
 – в плазме крови **2: 591**
 – в цитозоле и внеклеточной жидкости **1: 634**
 Хлорные каналы
 – в сигнальных путях **1: 633–635**
 – при кистозном фиброзе **1: 565, 566, 579**
 Хлоропласты **1: 26, 159; 2: 405, 406**
 – АТФ-синтаза **2: 384**
 – ДНК **3: 12**
 – интеграция фотосистем I и II **2: 367, 372, 373, 377, 379**
 – мембранные липиды **1: 500, 526, 527**
 – метаболизм липидов **2: 453, 454**
 – синтез
 –– АТФ **2: 377**
 –– NADPH **2: 375, 454, 455**
 –– жирных кислот **2: 453, 454**
 –– крахмала **2: 426–430**
 – транспорт белков **3: 210, 215**
 – фотосинтез **2: 366**
 – эволюция **2: 386, 387**

Хлорофилл **2: 359, 361–363**
 – антенны **2: 365**
 – передача возбуждения **2: 364–366**
 – типы **2: 361, 363**
 Хлороформ, для экстракции липидов **1: 515, 516**
 Хогланд Малон **1: 10; 3: 166**
 Ходжкин Дороти Кроуфут **2: 240**
 Холдейн Дж. Б. С. **1: 269, 270, 280, 287**
 Холдейн Хейзел **1: 258**
 Холекальциферол (витамин D₃) **1: 510, 511**
 Холерный токсин **1: 324, 677**
 Холестерин **1: 504**
 – биосинтез **2: 479–484**
 – в мембранах **1: 526, 527, 545, 632**
 – в синтезе изопреноидов **2: 479–484, 497**
 – в синтезе стероидных гормонов **2: 495, 496**
 – и *транс*-жирные кислоты **1: 494**
 – избыточный синтез **2: 492**
 – липопротеиновые комплексы **2: 227, 228**
 – медикаментозное снижение содержания **2: 493, 494**
 – опосредованный рецепторами эндоцитоз **2: 490, 491**
 – регуляция синтеза **2: 491, 492**
 – структура **1: 504**
 – транспорт **2: 485–489**
 –– обратный **2: 488, 489**
 – этерификация **2: 484, 485**
 – эфиры **2: 484, 485**
 Холецистокенин **2: 264**
 Холидея структуры **3: 84, 85, 89, 93**
 Холли Роберт **3: 166**
 Холофермент **1: 271**
 Хондроитинсульфат **1: 364, 365**
 Хоризмат, в биосинтезе аминокислот **2: 524, 526–528**
 Хоминг **3: 148, 149**
 Хроматиды сестринские **3: 82, 83**
 Хроматин **3: 27**
 – активный/неактивный **3: 257, 258**
 – ацелирование/деацелирование **3: 257, 258**
 – в 30-нм волокнах **3: 31, 34**
 – гетерохроматин **3: 257**
 – и гистоны **3: 27–29, 258**
 – изменения при транскрипции **3: 257, 258**
 – конденсированный **3: 257**
 – нуклеосомы **3: 27–35**
 – ремоделирование **3: 258**
 – сборка **3: 27–35**
 – эухроматин **3: 32, 257**

- Хроматография
 – адсорбционная **1: 515, 516**
 – аффинная **1: 134, 135**
 – высокоэффективная жидкостная **1: 135**
 – газожидкостная **1: 516, 517**
 – ионообменная **1: 132–134**
 – колоночная **1: 132, 135, 254**
 – тонкослойная **1: 169, 515, 516**
 – эксклюзионная **1: 134**
 Хроматофор **2: 382**
 Хромосомы **3: 27**
 – бактериальные **1: 439, 442; 3: 10, 36, 37**
 – димерные, репарация **3: 93, 94**
 – дочерние **1: 403**
 – дрожжевые искусственные **1: 442, 443; 3: 15**
 – конденсация **3: 27**
 – структура **3: 27–35**
 – эукариотические **3: 11, 27–35**
 Хугстин Карст **1: 406**
 Хугстиновские пары **1: 406**
 Хэтч Маршалл **2: 424**
- Ц**
 Цветовое зрение **1: 654–656**
 Цвиттер-ион **1: 123**
 Целакант, анаэробный метаболизм **2: 92**
 Целебрекс **2: 462, 463**
 Целлюлаза **1: 355**
 Целлюлоза **1: 355, 357; 2: 431**
 – синтез **2: 432–434**
 Целлюлозосинтаза **2: 432–434**
 Цельвегера синдром **2: 246**
 Центральная догма молекулярной биологии **3: 6, 144**
 Центрифугирование
 – дифференциальное **1: 23, 24**
 – изопикническое **1: 23, 24**
 Центромера **3: 14**
 α-Цепь коллагена **1: 187, 188**
 Церамид **1: 502, 505**
 – регуляторная функция **1: 507**
 Цереброзиды **2: 478–478**
 Церулоплазмин **1: 372, 373**
 Цетуксимаб (эрбитукс) **1: 669**
 Цианобактерии **1: 21, 61; 2: 203**
 – фиксация азота **2: 6, 510**
 – фотофосфорилирование **2: 372, 373**
 – эволюция **1: 58–60; 2: 386, 387**
 Цианокобаламин **2: 240**
 Цикл лимонной кислоты (цикл трикарбоновых кислот, цикл Кребса) **2: 181–207**
 ---- активация ацетата **2: 182**
 ---- анаплеротические реакции **2: 204**
 ---- в метаболизме глюкозы **2: 582**
 ---- в метаболизме липидов **2: 584**
 ---- в печени **2: 582–584**
 ---- и глиоксилатный цикл **2: 211–213**
 ---- компоненты **2: 203**
 ---- неполный, в анаэробных бактериях **2: 202**
 ---- образование изоцитрата **2: 192**
 ---- образование цитрата **2: 190**
 ---- окисление
 ---- ацетата **2: 202**
 ---- изоцитрата до α-кетоглутарата и CO₂ **2: 192**
 ---- малата до оксалоацетата **2: 199**
 ---- сукцината до фумарата **2: 198**
 ---- онкогенные мутации **2: 211**
 ---- открытие **2: 222**
 ---- пируватдегидрогеназный комплекс **2: 182–187**
 ---- пируваткарбоксилазная реакция **2: 205, 206**
 ---- превращение сукцинил-СoA в сукцинат **2: 196**
 ---- продукты **2: 201**
 ---- реакции **2: 188, 189**
 ---- регуляция **2: 208–211**
 ---- связь с циклом мочевины **2: 275, 276**
 ---- стадии **2: 190**
 ---- энергия окисления **2: 201**
 Цикл мочевины **2: 273–279**
 -- генетические дефекты **2: 277–279**
 -- связь с циклом лимонной кислоты **2: 275, 276**
 Циклинзависимые протеинкиназы (CDK) **1: 661–664**
 -- ингибирование **1: 664**
 -- продукты онкогенов **1: 668, 669**
 Циклины **1: 661–664; 3: 64**
 Циклический АМР, см. сАМР
 Циклический GMP, см. сGMP
 Циклогексимид **3: 209**
 Циклооксигеназа (COX) **2: 461, 462**
 – ингибиторы **2: 461, 462**
 Циклосерин **2: 538**
 Циметидин **2: 542**
 Цинга **1: 189–191**
 Цинковые пальцы **3: 240, 241**
 Ципрофлоксацин **3: 24**
 Цис-конфигурация пептидной связи **1: 182, 183**
 Цистатионин-β-синтаза **2: 522**
 – дефект **2: 287**
 Цистатионин-γ-лиаза **2: 522**
 Цистеин **1: 120, 121, 146**
 – биосинтез **2: 519, 521, 522, 532**
 – в железосерных кластерах **2: 311**
 – расщепление до пирувата **2: 285**
 Цистин **1: 120, 121, 146**
 Цис-транс-изомеры **1: 34**
 Цитидилат **1: 393**
 Цитидилатсинтаза **2: 549**
 Цитидин **1: 393, 400, 419**
 Цитидиндифосфат (CDP) **2: 471, 472**
 Цитидинмонофосфат (CMP) **1: 547; 2: 471**
 Цитидинтрифосфат (CTP) **1: 48**
 Цитозин **1: 392, 393, 399, 424**
 – дезаминирование **1: 416, 417**
 – метилирование **1: 419**
 Цитозоль **1: 18**
 – метаболизм липидов **2: 454**
 – синтез сахарозы **2: 436**
 – синтез целлюлозы **2: 433**
 Цитокинины **1: 470**
 Цитокины **1: 624, 475**
 – в регуляции клеточного цикла **1: 664**
 Цитоплазма **1: 18, 20, 24**
 – филаменты **1: 24**
 Цитоскелет **1: 24, 25**
 Цитотоксические Т-клетки (Т_с-клетки) **1: 250**
 Цитохромоксидаза **1: 271; 2: 313, 318, 320, 460; см. также Комплекс IV**
 Цитохромы **2: 48, 309, 310, 312**
 – *b5* **2: 459**
 -- цитохром-*b5*-редуктаза **2: 459**
 – *b6f* **2: 365, 372, 373, 376–379, 387**
 – *bc1* **2: 317, 318, 368, 370; см. также Комплекс III**
 – *c* **1: 129, 130, 139, 200; 2: 309, 310, 313, 318, 350, 387**
 – *f* **1: 84; 2: 376**
 – P-450 **2: 348, 349, 459, 460, 496**
 – связь фотосистем I и II **2: 372, 373, 376**
 Цитрат **2: 192, 200**
 – асимметрические реакции **2: 199, 200**
 – в синтезе жирных кислот **2: 455, 456**
 – образование в цикле лимонной кислоты **2: 188, 190**
 – переносчик **2: 455, 456**
 Цитратлиаза **2: 456**
 Цитратсинтаза **2: 190, 191, 204, 455, 456**
 Цитруллин **1: 122, 123, 162**
 Цукеркандл Эмиль **1: 156, 433**

Ч

- Чаргафф Эрвин **1: 400**
 Чаргаффа правила **1: 400, 401**
 Чейз Марта **1: 400**
 Четвертичная структура белков
1: 141, 185–214
 Чек Томас **3: 126**
 Число оборотов (k_{cat}) **1: 291**
 Чувствительные нейроны **1: 633–659**

Ш

- Шайн Джон **3: 196**
 Шайна–Дальгарно последовательность **3: 196, 197**
 Шалли Эндрю **3: 567**
 Шанже Жан-Пьер **1: 242**
 Шаперонины **1: 212–214**
 Шапероны **1: 53, 158, 212, 213, 487; 3: 253, 258**
 Шаро-стержневая модель **1: 178, 188**
 Шарп Филипп **3: 125**
 Шатгл-вектор **1: 443**
 Шафрив Элеазар **2: 468**
 Шпильки
 – в аттенуаторе **3: 247**
 – в ДНК **1: 406**
 – в РНК **1: 409, 410; 3: 116, 142, 190, 247, 252, 270**
 Шульц Петер **1: 308**
 Шумейкер Джеймс **2: 295**

Щ

- Щелочная фосфатаза **1: 435, 485**
 Щитовидная железа **2: 571**
 – гормоны **2: 571, 575; см. также**
 Тиреоидные гормоны

Э

- Эволюционное древо **1: 19, 159, 160**
 Эволюция **1: 19, 20, 54**
 – *in vitro* (SELEX) **3: 154–158**
 – адаптация к водной среде **1: 73**
 – бактерий **1: 21; 2: 508, 509**
 – галапагосских выюрок **3: 278–280**
 – горизонтальный перенос генов
1: 157
 – и гипотеза «мира РНК» **1: 55, 56; 3: 153–159**
 – и гомологии в белках и генах
1: 60–62, 155–161
 – и семейства белков **1: 157–159, 203**
 – иммунной системы **3: 97, 98**
 – интронов **3: 148**
 – Миллера–Юри эксперимент **1: 55**
 – митохондрий **2: 352**
 – молекулярных паразитов **3: 97, 155**
 – ретротранспозонов **3: 148**

- роль аденина **3: 152, 153**
 – роль мутаций **1: 54; 3: 278–280**
 – роль эндосимбиоза **1: 59, 60; 2: 352**
 – фотосинтеза **2: 385–387**
 – хлоропластов **2: 386**
 – цианобактерий **2: 181, 386, 387**
 – эукариотических клеток **1: 59, 60**
 Этр Питер **1: 571**
 Эдельман Джеральд **1: 251**
 Эдман Пер **1: 145**
 Эйвери Т. Освальд **1: 400**
 Эйвери–Маклеода–МакКарти эксперимент **1: 400**
 Эйкозановая кислота **1: 488**
 Эйкоаноиды **1: 507–510; 2: 458, 574; см. также** Лейкотриены; Простагландины; Тромбоксаны
 – сигнальная функция **2: 572, 574**
 – синтез **2: 458, 461, 574**
 Эйкозатриеноат и эйкозатетраеноат, синтез **2: 461**
 Эйлер–Челпин Ганс **2: 66**
 Эймс Брюс **3: 67**
 Эймса тест **3: 67**
 Экзергонические реакции **1: 44–46, 558**
 – сопряжение с эндергоническими реакциями **1: 44–46, 558**
 Экзонуклеазы **3: 48**
 – III **1: 435**
 – бактериофага λ **1: 435**
 – в репарации ДНК **3: 50, 51, 70, 71**
 – корректирующая активность
3: 51–54, 63
 Экзоны **3: 12, 13, 122**
 – транскрипция **3: 123, 131–133**
 Экзоцитоз **1: 25**
 Экситон **2: 361**
 – перенос **2: 361**
 Экспрессия генов **3: 230**
 – индукция **3: 230**
 – конститутивная **3: 230**
 – регуляция **3: 229–280**
 – репрессия **3: 230, 231**
 Эксцизионная нуклеаза **3: 74**
 Эксцизионная репарация **3: 68**
 – нуклеотидов **3: 73, 74**
 – оснований **3: 71–73**
 Элайон Гертруда **2: 505, 557**
 Эластин, и протеогликины **1: 359, 367**
 Эластичности коэффициент
2: 134–136
 Электрический заряд
 – аминокислот **1: 120, 125**
 – влияние рН **1: 120, 125**
 Электрогенный транспорт **1: 559**
 Электродвижущая сила **2: 44**

- Электролиты, содержание в плазме
2: 591, 592
 Электромагнитное излучение **2: 359**
 Электронейтральный транспорт
1: 558
 Электронпереносный флавопротеин (ETF) **2: 234**
 Электроны
 – акцепторы универсальные **2: 307**
 – в молочнокислом брожении **2: 90, 91**
 – переносчики **2: 44, 45**
 – NADH и NADPH **2: 49, 50**
 – специализированные **2: 49**
 – универсальные **2: 49, 50**
 – стандартный восстановительный потенциал **2: 47**
 Электроотрицательность атомов
1: 75, 76
 Электропорация **1: 439**
 Электроспрей (ESI-масс-спектрометрия) **1: 149**
 Электростатические взаимодействия с водой **1: 75, 77**
 Электрофилы, в ферментативных реакциях **1: 304; 2: 21–24**
 Электрофорез
 – белков **1: 136–139**
 – в клонировании **1: 449**
 – в секвенировании ДНК **1: 420–422**
 – двумерный **1: 139, 463; 2: 126**
 – ДНК **1: 454–456**
 – пульсирующий **1: 443**
 Электрохимический градиент **1: 551; 2: 323**
 – в поляризации мембраны **1: 634**
 – изменение свободной энергии
1: 560; 2: 323
 Элементы гормонального ответа (HRE) **1: 643; 3: 267, 268**
 Элерса–Данлоса синдром **1: 191**
 Элиминирования реакции **2: 20, 23, 25**
 Эллиптицин **3: 25**
 Элонгация **3: 179, 180, 199–202**
 – в транскрипции **3: 106, 112, 118**
 Эльвейм Конрад **2: 53**
 Эмбден Густав **2: 66**
 Эмбриональное развитие, регуляция генов **3: 271–279**
 Энантиомеры **1: 35, 36**
 – моносахариды **1: 341**
 Эндергонические реакции **1: 44–46, 558**
 – сопряжение с экзергоническими реакциями **1: 44–46, 558**
 Эндо Акиро **2: 493, 494**

- Эндокринные железы **2: 576, 577**
— секреция гормонов **2: 566, 574, 578**
- Эндонуклеазы **3: 48**
— АР-эндонуклеаза **3: 73**
— в репарации ДНК **3: 69, 73, 74**
— рестрикции **1: 434–438**
— в создании библиотек ДНК **1: 449**
- Эндоплазматический ретикулум
— α -окисление **2: 249**
— посттрансляционная модификация белков **3: 211**
— синтез жирных кислот **2: 457, 458**
— ферменты семейства Р-450 **2: 349**
- Эндосимбиоз **1: 59, 60; 2: 352, 386**
- Эндосимбиотические бактерии, эволюция хлоропластов **1: 60; 2: 386**
- Эндоцитоз **1: 25**
— опосредованный рецепторами **2: 490; 3: 219**
- Энергетический метаболизм **2: 6–10**
- Энергетическое сопряжение реакций **1: 45**
- Энергия активации **1: 47, 48, 274**
— белковых конформаций **1: 172, 173**
— Гиббса (G) **1: 44, 47; 2: 13–15**
— диссоциации **1: 75**
— запасенная в АТФ **1: 45, 425 2: 29, 587, 588**
— и константа скорости **1: 277**
— источники в организме **2: 600**
— конформации сахаров **1: 357**
— мембранного транспорта **1: 550–559**
— протондвижущая сила **2: 323**
— растворения **1: 79**
— света, поглощение хлорофиллом **2: 359, 360**
— связывания **1: 277**
— солнечная **1: 105; 2: 6, 356–358**
— термодинамические законы преобразования в организме **2: 12–20**
— ферментативной реакции **1: 274–282**
— фолдинга **1: 173, 174, 179, 211, 212**
- Энергия диссоциации **1: 75**
- Энтальпия (H) **1: 44; 2: 13**
— изменение (ΔH) **1: 76; 2: 14**
- Энтеропептидаза **2: 264**
- Энтропия (S) **1: 44; 2: 13**
— и стабильность белков **1: 211, 212**
— изменение (ΔS) **1: 44, 212, 282; 2: 14**
— снижение в ферментативных реакциях **1: 282**
- Энхансеры **3: 233, 260**
- Энцефалопатия, митохондриальная **2: 354**
- Эпигенетика **3: 32**
- Эпимеры **1: 343, 361**
- Эпитоп **1: 250, 254**
— в очистке белковых комплексов **1: 467**
— каталитические антитела **1: 308**
- Эргокальциферол (витамин D₂) **1: 511**
- Эритроза **1: 342**
- Эритрозо-4-фосфат, в цикле Кальвина **2: 413, 414**
- Эритропоэтин **1: 624**
— рекомбинантный **1: 479**
— рецептор **1: 625**
- Эритроциты **1: 233, 373, 479; 2: 591, 592**
— JAK-STAT-путь **1: 624**
— аквапорины **1: 570, 571**
— гликофорин **1: 369, 527, 531**
— изменение свободной энергии в реакциях гликолиза **2: 98**
— мембранные белки **1: 530, 531**
— образование **1: 233**
— транспорт глюкозы **1: 553, 554**
— форма **1: 246, 247**
— хлоридно-бикарбонатный обменник **1: 556–558**
- Эритролула **1: 342**
- Эрлотиниб (тарцева) **1: 669**
- Эстрадиол **1: 509, 647; 2: 495**
- Эстрогены **1: 643, 644; 2: 495**
— синтез **2: 575**
- Этан **2: 46**
- Этанол, см. Спирты
- Этаноламинкиназа, мутации **2: 474**
- Этилен, рецепторы в растениях **1: 647**
- Этопозид **3: 25**
- Эубактерии **1: 19, 21**
- Эукариоты
— ДНК **3: 11–15**
— клеточный цикл **1: 660**
— структура клеток **1: 18, 22, 24**
— эволюция **1: 19, 59, 60**
- Эухроматин **3: 257**
- Эфиры, гидролиз
— изменение стандартной свободной энергии **2: 16**
— переходное состояние **1: 307**
— сложных эфиров и тиоэфиров **2: 33, 34**
- Эффекторы **3: 232**
- Я**
- Яблочный фермент, см. Малатдегидрогеназа
- Ягендорф Андраэ **2: 382**
- Ядерные белки **3: 216, 217**
- Ядерные рецепторы **1: 595**
- Ядерные факторы транскрипции **3: 268**
- Ядерный магнитный резонанс (ЯМР)
— в анализе углеводв **1: 380**
— в определении структуры белка **1: 197–199**
- Ядро **1: 18**
— транспорт белков **3: 216, 217**
- Яды
— и ионные каналы **1: 579, 581**
— ингибирование трансляции **3: 207–209**
- Язва желудка **1: 61, 374**
- Яичники **2: 575, 576**
- Ялоу Розалин **2: 568, 569**
- ЯМР, см. Ядерный магнитный резонанс
- Янг Уильям **2: 71**
- Янус-киназа (JAK) **1: 624; 2: 608**

Предисловие к русскому изданию	5	Дополнение 1–2. Луи Пастер и оптическая активность: <i>In vino veritas</i>	37
Краткое содержание трех томов	6	Взаимодействия между биомолекулами являются стереоспецифическими	38
Об авторах книги	7	Краткое содержание	40
Несколько слов о науке	9	1.3. Физические основы биохимии	40
Предисловие	11	Живые организмы находятся в динамическом стационарном состоянии, но не в равновесии с окружающей средой	40
Благодарности	12	Организмы перерабатывают энергию и вещества из окружающей среды	41
1 Основы биохимии	15	Дополнение 1–3. Энтропия: преимущество беспорядка	42
1.1. Принципы организации клетки	17	Поток электронов обеспечивает организм энергией	43
Клетки являются структурными и функциональными единицами всех живых организмов	17	Создание и поддержание порядка требуют совершения работы и затрат энергии	43
Размеры клеток лимитированы диффузией кислорода	18	Энергетическое сопряжение в биологических реакциях	44
Существуют три царства живых организмов	19	На возможность самопроизвольного протекания реакции указывают K_{eq} и ΔG°	47
Бактерия <i>Escherichia coli</i> – наиболее изученная бактерия	20	Ферменты способствуют ускорению химических реакций	47
Эукариотические клетки содержат разнообразные мембраносвязанные органеллы, которые можно выделить и исследовать	24	Сбалансированная и экономичная работа клетки достигается путем регуляции метаболизма	49
Цитоплазма имеет цитоскелет и обладает динамическими свойствами	24	Краткое содержание	50
В клетках существуют надмолекулярные структуры	25	1.4. Генетические основы биохимии	50
В исследованиях <i>in vitro</i> можно не заметить важных взаимодействий между молекулами	27	Генетическая информация (наследственность) заключена в молекулах ДНК	51
Краткое содержание	28	Структура ДНК позволяет осуществлять репликацию и репарацию с почти абсолютной точностью	52
1.2. Химические основы биохимии	28	Линейная последовательность ДНК кодирует белки с трехмерной структурой	53
Биомолекулы представляют собой органические соединения, содержащие различные функциональные группы	29	Краткое содержание	53
Клетки содержат универсальный набор небольших молекул	32	1.5. Эволюционные основы биохимии	54
Основными компонентами клеток являются макромолекулы	32	Изменения наследственной информации создают возможность для эволюции	54
Дополнение 1–1. Абсолютная и относительная молекулярная масса. Единицы измерения	32	Биомолекулы возникли в процессе химической эволюции	55
Трехмерная структура характеризуется конфигурацией и конформацией	33		

РНК и схожие с ней предшественники могли быть первыми генами и катализаторами	56	Ван-дер-ваальсовы взаимодействия обусловлены слабыми силами межатомного притяжения	82
Биологическая эволюция началась более трех с половиной миллиардов лет назад	57	Слабые взаимодействия играют очень важную роль в структуре и функциях макромолекул	82
Первые клетки, вероятно, были хемогетеротрофами	58	Растворенные вещества изменяют свойства воды	84
Эукариотические клетки возникли в несколько стадий из более простых предшественников	59	Краткое содержание	88
Молекулярное строение раскрывает эволюционные связи	60	2.2. Диссоциация воды. Слабые кислоты и слабые основания	89
Функциональная геномика указывает назначение генов в специфических клеточных процессах	62	В чистой воде мало ионов	89
Сравнительный анализ геномов играет все большую роль в биологии человека и медицине	62	Диссоциацию воды можно охарактеризовать величиной константы равновесия	90
Краткое содержание	63	Шкала pH: обозначения концентраций ионов H^+ и OH^-	91
Ключевые термины	63	Слабые кислоты и основания характеризуются константами диссоциации	93
Дополнительная литература для дальнейшего изучения	63	Значения pK_a слабых кислот можно определить из кривых титрования	94
Вопросы и задачи	65	Краткое содержание	96
Анализ экспериментальных данных	68	2.3. Роль буферных систем в поддержании pH в биологических системах	96
I СТРОЕНИЕ И КАТАЛИЗ		Буферы — это смеси слабых кислот и сопряженных оснований	97
2 Вода	73	Уравнение Хендерсона–Хассельбаха. pH, pK_a и концентрации компонентов в буферной системе связаны простым соотношением	98
2.1. Слабые взаимодействия в водных средах	73	Слабые кислоты и основания служат буферами в клетках и тканях	98
Необычные свойства воды обусловлены наличием водородных связей	74	При отсутствии лечения диабет приводит к угрожающему состоянию — ацидозу	102
Вода образует водородные связи с полярными растворенными веществами	76	Дополнение 2–1. Медицина. Побывать немного кроликом (Не пытайтесь повторить этот опыт!)	103
Между водой и заряженными веществами существуют электростатические взаимодействия	77	Краткое содержание	104
При растворении кристаллических веществ энтропия возрастает	79	2.4. Участие воды в реакциях	104
Неполярные газы плохо растворяются в воде	79	Краткое содержание	105
Неполярные вещества при растворении вызывают энергетически невыгодные изменения в структуре воды	79	2.5. Живые организмы приспособлены к водной среде	105

Ключевые термины	106	3.3. Как работать с белками	132
Дополнительная литература для дальнейшего изучения	106	Белки можно разделить и очистить	132
Вопросы и задачи	107	Белки можно разделить и охарактеризовать методом электрофореза	136
Анализ экспериментальных данных	111	Возможность контролировать содержание белка в неразделенных смесях	139
<hr/>		Краткое содержание	140
3 Аминокислоты, пептиды и белки	113	3.4. Структура белка: первичная структура	141
3.1. Аминокислоты	114	Функция белка зависит от аминокислотной последовательности	142
Структура аминокислот.		Уже расшифрованы аминокислотные последовательности миллионов белков	142
Общие закономерности	114	Короткие полипептиды секвенируют с помощью автоматических секвенаторов	143
Аминокислотные остатки в белках являются L-стереоизомерами	118	Крупные белки перед секвенированием необходимо разделить на фрагменты	145
Классификация аминокислот на основании их R-групп	118	Аминокислотную последовательность можно вывести на основании других данных	148
«Нестандартные» аминокислоты также выполняют важные функции	120	Дополнение 3–2. Практическая биохимия. Масс-спектрометрические методы при изучении белков	149
Дополнение 3–1. Практическая биохимия. Поглощение света: закон Ламберта–Бера	121	Небольшие пептиды и белки можно синтезировать химическим путем	152
Аминокислоты могут действовать как кислоты или основания	123	Аминокислотная последовательность служит источником важной биохимической информации	154
Аминокислоты имеют характерные кривые титрования	123	Дополнение 3–3. Консенсусные последовательности и Sequence logos	155
По кривой титрования можно предсказать электрический заряд аминокислоты	125	Белковая последовательность проливает свет на развитие жизни на Земле	156
Аминокислоты различаются по кислотно-основным свойствам	126	Краткое содержание	161
Краткое содержание	127	Ключевые термины	161
3.2. Пептиды и белки	127	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	161
Пептиды — это цепочки из аминокислот	127	Вопросы и задачи	162
Пептиды различаются по способности переходить в ионную форму	128	Анализ экспериментальных данных	168
Биологически активные пептиды и полипептиды сильно различаются по размерам и составу	129		
Некоторые белки имеют в составе не только аминокислотные остатки, но и другие группы	131		
Краткое содержание	131		

4	Трехмерная структура белков	171	Глобулярные белки имеют разные типы третичной структуры	195	
4.1.	Обзор белковых структур	172	Дополнение 4–5. Методы. Методы определения трехмерной структуры белка	196	
	Конформация белка в значительной степени стабилизирована слабыми взаимодействиями	172	Белковые мотивы — основа классификации белковых структур	202	
	Пептидные связи обладают жесткостью и плоской конфигурацией	174	Четвертичная структура белка варьирует от простых димеров до больших комплексов	205	
	Краткое содержание	177	Краткое содержание	208	
4.2.	Вторичная структура белка	177	4.4. Денатурация и фолдинг белка	208	
	α -Спираль — это распространенный вид вторичной структуры белка	177	Нарушение структуры приводит к потере белком своих функций	208	
Дополнение 4–1. Методы. Как отличить правую спираль от левой?		179	Аминокислотная последовательность определяет трехмерную структуру	209	
	Последовательность аминокислот влияет на стабильность α -спирали	179	Свертывание полипептидной цепи происходит быстро и поэтапно	210	
	Участки полипептидных цепей с β -конформацией образуют β -слои	181	Фолдинг некоторых белков протекает при участии молекулярных шаперонов	212	
	В белковой структуре часто встречаются β -повороты	182	Нарушения фолдинга белка могут быть причиной целого ряда генетических заболеваний человека	215	
	Вторичные структуры белка характеризуются определенными углами связей	183	Дополнение 4–6. Медицина. Смерть из-за неправильного сворачивания белка: прионы	217	
	Вторичные структуры можно идентифицировать с помощью метода кругового дихроизма	184	Краткое содержание	219	
	Краткое содержание	184	Ключевые термины	219	
4.3.	Третичная и четвертичная структуры белка	184	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	219	
	Фибриллярные белки адаптированы для выполнения структурной функции	185	Вопросы и задачи	220	
Дополнение 4–2. Перманентная завивка волос — пример биохимической технологии		187	Биохимия в Интернете	223	
Дополнение 4–3. Медицина. Почему морякам, путешественникам и студентам нужно есть свежие фрукты и овощи		189	Анализ экспериментальных данных	223	
	Разнообразие структуры отражает функциональное многообразие глобулярных белков	192			
Дополнение 4–4. Protein Data Bank		193	5	Функции белков	225
	Исследование структуры миоглобина позволило подобрать первые ключи к разгадке глобулярной структуры белка	194	5.1. Обратимое связывание белков с лигандами: белки, связывающие кислород	226	
			Кислород связывается с протетической группой — гемом	226	
			В миоглобине один участок связывания кислорода	228	
			Количественное описание взаимодействий белков с лигандами	229	

Структура белка влияет на связывание с лигандом	232	Упорядоченные структуры тонких и толстых нитей образуются при участии других белков	258
Гемоглобин переносит кислород в крови	233	Толстые нити миозина скользят по тонким нитям актина	260
Субъединицы гемоглобина имеют структуру, сходную со структурой миоглобина	233	Краткое содержание	262
Связывание кислорода сопровождается структурными перестройками гемоглобина	235	Ключевые термины	262
Связывание кислорода с гемоглобином — кооперативный процесс	237	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	262
Кооперативное связывание лиганда можно описать количественно	239	Вопросы и задачи	263
Дополнение 5–1. Медицина.		Биохимия в Интернете	265
Угарный газ: невидимый убийца	240	Анализ экспериментальных данных	266
Две модели кооперативного связывания	242		
Гемоглобин переносит H^+ и CO_2	242		
Связывание кислорода с гемоглобином регулируется 2,3-бисфосфоглицератом	245		
Серповидноклеточная анемия — «молекулярная болезнь» гемоглобина	246		
Краткое содержание	248		
5.2. Комплементарное взаимодействие между белками и лигандами: иммунная система и иммуноглобулины	249		
Иммунный ответ определяется действием ряда специализированных клеток и белков	249		
Антитела имеют два идентичных центра связывания антигена	251		
Антитела связывают антигены прочно и с высокой специфичностью	253		
Взаимодействие антитела с антигеном лежит в основе многих аналитических методов	254		
Краткое содержание	256		
5.3. Энергозависимые взаимодействия белков: актин, миозин и молекулярные моторы	256		
Миозин и актин — основные белки мышц	257		
		6 Ферменты	269
		6.1. Введение	270
		Большинство ферментов являются белками	271
		Ферменты классифицируют в соответствии с катализируемыми ими реакциями	272
		Краткое содержание	273
		6.2. Как работают ферменты	273
		Ферменты влияют на скорость реакции, но не сдвигают равновесие	273
		Скорость реакции и равновесие связаны с определенными термодинамическими параметрами	276
		Некоторые принципы, объясняющие высокую каталитическую активность и специфичность ферментов	277
		Слабые взаимодействия между ферментом и субстратом наиболее благоприятны в переходном состоянии	278
		Энергия связывания определяет специфичность и скорость катализа	281
		Роль специфических каталитических групп в катализе	283
		Краткое содержание	285
		6.3. Ферментативная кинетика и методы изучения механизма действия ферментов	285
		Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата	286

Количественное соотношение между концентрацией субстрата и скоростью реакции	287	Во многих метаболических путях регуляторная стадия катализируется аллостерическим ферментом	321
Дополнение 6–1. Преобразование уравнения Михаэлиса–Ментен: график в двойных обратных координатах	289	Поведение аллостерических ферментов отклоняется от кинетики Михаэлиса–Ментен	322
Использование кинетических параметров для сравнения активностей ферментов	290	Регуляция некоторых ферментов происходит путем обратимой ковалентной модификации	323
Многие ферменты катализируют реакции с участием двух и большего числа субстратов	293	Фосфорилирование влияет на структуру и каталитическую активность белков	324
Предстационарная кинетика может дать дополнительную информацию о последовательности стадий реакции	294	Множественное фосфорилирование позволяет осуществлять тонкую регуляцию	325
Ферменты могут подвергаться обратимому и необратимому ингибированию	295	Некоторые ферменты и другие белки регулируются путем протеолитического расщепления предшественника	328
Дополнение 6–2. Кинетические методы для определения типа ингибирования	296	Некоторые регуляторные ферменты используют несколько механизмов регуляции	329
Зависимость ферментативной активности от pH	299	Краткое содержание	330
Краткое содержание	299	Ключевые термины	330
6.4. Примеры ферментативных реакций	300	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	331
Механизм действия химотрипсина включает стадии ацилирования и деацилирования остатка серина	301	Вопросы и задачи	332
Дополнение 6–3. Доказательства комплементарности фермента и переходного состояния	306	Анализ экспериментальных данных	337
Индукцированное соответствие при связывании субстрата с гексокиназой	308	<hr/> 7 Углеводы и гликобиология 339 <hr/>	
Механизм реакции енолазы требует присутствия ионов металла	309	7.1. Моносахариды и дисахариды 340	
Механизм действия лизоцима включает две последовательные стадии нуклеофильного замещения	310	Существует два семейства моносахаридов — альдозы и кетозы	340
Понимание механизмов действия ферментов стимулирует развитие медицины	314	Моносахариды содержат асимметрические атомы	341
Краткое содержание	319	Обычные моносахариды имеют циклическую структуру	343
6.5. Регуляторные ферменты 319		Живые организмы содержат множество производных гексозы	345
Аллостерические ферменты претерпевают конформационные изменения в ответ на связывание модулятора	320	Моносахариды — это восстановители	347
		Дополнение 7–1. Медицина. Определение уровня глюкозы крови при диагностике и лечении диабета	348
		Дисахариды содержат гликозидную связь	348
		Краткое содержание	352

7.2. Полисахариды	352	8 Нуклеотиды	391
Некоторые гомополисахариды служат для запасания энергии клеткой	353	и нуклеиновые кислоты	391
Некоторые гомополисахариды выполняют структурную функцию	355	8.1. Основные понятия	391
На трехмерную структуру гомополисахаридов влияют стерические факторы и образование водородных связей	356	В состав нуклеотидов и нуклеиновых кислот входят определенные основания и пентозы	392
Клеточные стенки бактерий и водорослей содержат структурные гетерополисахариды	358	Нуклеотиды в нуклеиновых кислотах последовательно связаны фосфодиэфирными связями	396
Гликозаминогликаны — гетерополисахариды внеклеточного матрикса	359	Свойства азотистых оснований нуклеотидов влияют на трехмерную структуру нуклеиновых кислот	397
Краткое содержание	362	Краткое содержание	399
7.3. Гликоконъюгаты: протеоглики, гликопротеины и гликолипиды	363	8.2. Структура нуклеиновых кислот	400
Протеогликианы — макромолекулы клеточной поверхности и внеклеточного матрикса, содержащие гликозаминогликаны	364	ДНК — двойная спираль, обеспечивающая хранение и передачу генетической информации	400
Гликопротеины содержат ковалентно связанные олигосахариды	367	ДНК может иметь разные пространственные конфигурации	403
Гликолипиды и липополисахариды — компоненты мембран	369	Определенные последовательности ДНК могут иметь необычное пространственное строение	405
Краткое содержание	371	Матричные РНК содержат информацию о полипептидных цепях	408
7.4. Углеводы как информационные молекулы: сахарный код	371	Многие молекулы РНК имеют очень сложную трехмерную структуру	408
Лектины — белки, «читающие» код сахаров и участвующие во многих биологических процессах	372	Краткое содержание	412
Взаимодействие лектина с углеводом очень прочное и высокоспецифичное	376	8.3. Химия нуклеиновых кислот	412
Краткое содержание	379	Двойная спираль ДНК и РНК может денатурировать	413
7.5. Методы анализа углеводов	379	Нуклеиновые кислоты разных видов могут образовывать гибриды	414
Краткое содержание	381	Нуклеотиды и нуклеиновые кислоты подвергаются неферментативным превращениям	415
Ключевые термины	382	ДНК метилирована по некоторым основаниям	419
Дополнительная литература для дальнейшего изучения	382	Последовательность нуклеотидов ДНК можно определить	419
Вопросы и задачи	385	Химический синтез ДНК автоматизирован	423
Анализ экспериментальных данных	389	Краткое содержание	424
		8.4. Другие функции нуклеотидов	424
		Нуклеотиды переносят химическую энергию в клетке	424

Адениновые нуклеотиды входят в состав многих кофакторов ферментов	425		
Некоторые нуклеотиды могут быть сигнальными молекулами	427		
Краткое содержание	427		
Ключевые термины	427		
Дополнительная литература для дальнейшего изучения	428		
Вопросы и задачи	428		
Биохимия в Интернете	430		
Анализ экспериментальных данных	431		
<hr/>			
9 Технологии на основе информации из ДНК	433		
<hr/>			
9.1. Клонирование ДНК: основные понятия	434		
Эндонуклеазы рестрикции и ДНК-лигаза создают рекомбинантную ДНК	434		
Клонирование векторов позволяют амплифицировать встроенные сегменты ДНК	439		
Специфические последовательности ДНК определяют при гибридизации	443		
Экспрессия клонированных генов дает значительное количество белка	444		
Изменения в клонированных генах приводят к получению модифицированных белков	446		
В аффинной хроматографии связывание обеспечивают концевые последовательности	447		
Краткое содержание	448		
9.2. От генов к геномам	449		
Библиотеки ДНК представляют собой специализированные каталоги генетической информации	449		
Полимеразная цепная реакция амплифицирует специфические последовательности ДНК	452		
Дополнение 9–1. Мощный метод судебной экспертизы	454		
На основе нуклеотидных последовательностей генома создаются самые большие генетические библиотеки	457		
Краткое содержание	461		
9.3. От геномов к протеомам	461		
Взаимосвязи структуры и последовательности белка дают информацию о его функционировании	462		
Паттерны клеточной экспрессии могут прояснить функцию гена в клетке	463		
Белок-белковые взаимодействия помогают определить функцию молекул в клетке	466		
Краткое содержание	468		
9.4. Изменения генома и новые продукты биотехнологии	469		
Бактериальные паразиты растений помогают клонировать растения	469		
Манипулирование с геномами клеток животных дает информацию о структуре хромосом и об экспрессии генов	473		
Дополнение 9–2. Медицина. Геном человека и генная терапия человека	475		
Новые технологии сулят скорое открытие новых лекарств	478		
Технология рекомбинантных ДНК дает результаты и открывает новые перспективы	479		
Краткое содержание	480		
Ключевые термины	480		
Дополнительная литература для дальнейшего изучения	480		
Вопросы и задачи	482		
Анализ экспериментальных данных	485		
<hr/>			
10 Липиды	487		
<hr/>			
10.1. Запасные липиды	487		
Жирные кислоты — производные углеводов	487		
Триацилглицериды — эфиры жирных кислот и глицерина	491		
Триацилглицериды обеспечивают аккумуляцию энергии и теплоизоляцию	491		
При частичном гидрировании кулинарного жира образуются <i>транс</i> -жирные кислоты	492		

Дополнение 10-1. Кашалоты: жирные головы морских глубин	493	Долихолы активируют предшественников сахаров для биосинтеза	513
Воски служат хранилищами энергии и водоотталкивающими средствами	495	Многие природные пигменты — липиды с сопряженными двойными связями	514
Краткое содержание	495	Краткое содержание	514
10.2. Структурные липиды в мембранах	496	10.4. Методы анализа липидов	515
Глицерофосфолипиды — производные фосфатидной кислоты	497	Для экстракции липидов требуются органические растворители	515
В некоторые фосфолипиды жирные кислоты присоединены через простую эфирную связь	497	Методом адсорбционной хроматографии разделяют липиды разной полярности	515
Хлоропласты содержат галактолипиды и сульфолипиды	500	Методом газожидкостной хроматографии разделяют смеси летучих производных липидов	517
Археи содержат уникальные мембранные липиды	500	Путем специфического гидролиза можно определить строение липида	517
Сфинголипиды — производные сфингозина	501	Методом масс-спектрометрии можно полностью расшифровывать структуру липида	517
Сфинголипиды на поверхностях клеток — участки биологического распознавания	503	Липидомика занимается классификацией липидов и их функций	517
Фосфолипиды и сфинголипиды разрушаются в лизосомах	503	Краткое содержание	519
Стерины имеют четыре конденсированных углеродных кольца	504	Ключевые термины	519
Дополнение 10-2. Медицина. Наследственные болезни человека, возникающие в результате аномального накопления мембранных липидов	505	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	520
Краткое содержание	506	Вопросы и задачи	521
10.3. Липиды как сигнальные вещества, кофакторы и пигменты	506	Анализ экспериментальных данных	523
Фосфатидилинозиты и производные сфингозина работают как внутриклеточные сигналы	507	<hr/> 11 Биологические мембраны и транспорт <hr/>	525
Эйкозаноиды передают сигналы соседним клеткам	507	11.1. Состав и строение мембран	526
Стероидные гормоны передают сигналы между тканями	509	Каждый тип мембран содержит характерные липиды и белки	526
Сосудистые растения используют тысячи летучих сигнальных веществ	509	Все биологические мембраны обладают рядом фундаментальных свойств	527
Витамины А и D — предшественники гормонов	510	Липидный бислой — главный элемент структур биомембран	528
Витамины Е и К и липидные хиноны — окислительно-восстановительные кофакторы	512	Три типа мембранных белков различаются расположением в мембране	530
		Многие мембранные белки пронизывают липидный бислой	531

Интегральные белки взаимодействуют своими гидрофобными доменами с липидами и благодаря этому удерживаются в мембране	532	Активный транспорт приводит к перемещению веществ против градиента концентрации или электрохимического градиента	558
Трехмерную структуру мембранного белка можно предсказать по его последовательности	534	АТРазы Р-типа подвергаются фосфорилированию в каталитическом цикле	560
Ковалентно связанные липиды удерживают некоторые мембранные белки	536	АТРазы F-типа — это обратимые АТР-зависимые протонные насосы	563
Краткое содержание	538	АВС-транспортеры используют АТР для запуска активного транспорта множества субстратов	564
11.2. Динамика мембран	538	Дополнение 11-3. Медицина. Дефект ионных каналов при кистозном фиброзе	565
Ацильные группы внутри бислоя упорядочены в разной степени	538	Ионные градиенты снабжают энергией вторичный активный транспорт	567
Для движения липидов через бислой необходим катализ	540	Аквапорины образуют гидрофильные трансмембранные каналы для переноса воды	570
Липиды и белки латерально диффундируют в бислой	541	Ион-селективные каналы делают возможным быстрое перемещение ионов через мембраны	573
Сфинголипиды и холестерин объединяются в кластеры — мембранные рафты	543	Работу ионного канала можно изучать, измеряя электрические параметры	574
Дополнение 11-1. Методы. Атомно-силовая микроскопия для визуализации мембранных белков	544	Строение K^+ -канала определяется его специфичностью	575
Изгибание и слияние мембран — ключевые события во многих биологических процессах	546	Потенциалзависимые ионные каналы играют ключевую роль в работе нейронов	578
Некоторые интегральные белки — посредники в межклеточных взаимодействиях и адгезии	549	Дефектные ионные каналы могут приводить к неблагоприятным физиологическим последствиям	579
Краткое содержание	549	Краткое содержание	582
11.3. Транспорт веществ через мембраны	550	Ключевые термины	583
Пассивному транспорту способствуют мембранные белки	551	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	583
Транспортеры по их структурам можно сгруппировать в суперсемейства	552	Вопросы и задачи	585
В эритроцитах транспортер глюкозы опосредует пассивный транспорт	553	Биохимия в Интернете	589
Дополнение 11-2. Медицина. Нарушение транспорта глюкозы и воды при двух формах диабета	556	Анализ экспериментальных данных	589
Хлоридно-бикарбонатный обменник катализирует электронейтральный котранспорт анионов через плазматическую мембрану	556	<hr/> 12 Биосигнализация <hr/>	591
		12.1. Общие свойства систем передачи сигналов	591
		Дополнение 12-1. Методы. Количественная оценка взаимодействия лиганд–рецептор (анализ по Скэтчарду)	593
		Краткое содержание	596

12.2. Рецепторы, сопряженные с G-белком, и вторичные мессенджеры	596	12.5. Мультивалентные адаптерные белки и мембранные рафты	629
Система β -адренергического рецептора функционирует с участием вторичного мессенджера сАМР	597	Фосфорилированные остатки Туг, Ser или Thr связаны в белковые модули	629
Дополнение 12-2. Медицина. G-белки: два молекулярных переключателя в организме здорового и больного человека	600	Мембранные рафты и кавеолы могут обособлять сигнальные белки	632
Существует несколько механизмов завершения β -адренергического ответа	605	Краткое содержание	633
Десенситизация β -адренергического рецептора происходит в результате фосфорилирования или связывания с аррестином	606	12.6. Регулируемые ионные каналы	633
Циклический АМР действует как вторичный мессенджер для некоторых регуляторных молекул	607	В передаче электрических сигналов в возбудимых клетках главную роль играют ионные каналы	633
Диацилглицерин, инозиттрисфосфат и Ca^{2+} служат вторичными мессенджерами	609	Потенциалзависимые ионные каналы создают потенциалы действия в нейронах	635
Кальций является вторичным мессенджером для многих сигнальных путей	611	Ацетилхолиновый рецептор — регулируемый лигандом ионный канал	638
Дополнение 12-3. Методы. FRET: Биохимия, которую можно увидеть в живой клетке	612	Нейроны содержат рецепторные каналы, которые отвечают на действие различных нейромедиаторов	639
Краткое содержание	616	Токсины отравляют ионные каналы	640
12.3. Рецепторные ферменты	619	Краткое содержание	640
Стимуляция рецептора инсулина запускает каскад реакций фосфорилирования белков	619	12.7. Интегрины: двунаправленные рецепторы, ответственные за клеточную адгезию	641
Мембранный фосфолипид PIP_3 работает в одной из ветвей передачи сигнала инсулина	622	Краткое содержание	642
Сигнальная система JAK-STAT также использует тирозинкиназную активность	624	12.8. Регуляция транскрипции стероидными гормонами	643
Сигнальные системы связаны между собой сложным образом	625	Краткое содержание	644
Краткое содержание	626	12.9. Сигнализация у микроорганизмов и растений	644
12.4. Рецепторные гуанилатциклазы, cGMP и протеинкиназа G	627	Сигнализация у бактерий включает фосфорилирование в двухкомпонентной системе	644
Краткое содержание	629	Сигнальные системы растений содержат компоненты сигнальных систем микроорганизмов и млекопитающих	646
		Растения обнаруживают этилен с помощью двухкомпонентной системы и каскада MAPK	647
		Рецептороподобные протеинкиназы осуществляют передачу сигналов от пептидов и брассиностероидов	648
		Краткое содержание	650

12.10. Сенсорная передача сигнала в процессах зрения, обоняния и вкуса	650	Уровень циклинзависимых протеинкиназ осциллирует (колеблется)	660
В зрительной системе работает классический механизм GPCR	650	CDK регулируют клеточное деление путем фосфорилирования важных белков	664
Возбужденный родопсин осуществляет передачу сигнала через G-белок для уменьшения концентрации cGMP	652	Краткое содержание	666
Зрительный сигнал быстро прекращается	654	12.12. Онкогены, гены опухолевых супрессоров и программируемая гибель клетки	666
Колбочки — специализированные клетки, обеспечивающие цветное зрение	654	Онкогены — это мутантные формы генов белков, регулирующих клеточный цикл	666
Дополнение 12-4. Медицина. Цветовая слепота (нарушенное цветовосприятие): Джон Дальтон спланировал эксперимент, который был завершен более чем через столетие после смерти ученого	655	Дополнение 12-5. Медицина. Разработка противоопухолевых лекарственных препаратов на основе ингибиторов протеинкиназ	667
Обоняние и вкус у позвоночных основаны на сигнальных механизмах, подобных механизмам зрительной системы	656	Дефекты в генах опухолевых супрессоров приводят к устранению нормальных ограничителей клеточного деления	670
GPCR сенсорных систем и гормональной сигнализации имеют общие свойства	658	Апоптоз — программируемая гибель клетки	672
Краткое содержание	659	Краткое содержание	673
12.11. Регуляция клеточного цикла протеинкиназами	660	Ключевые термины	673
Клеточный цикл протекает в четыре стадии	660	Дополнительная литература для дальнейшего изучения	674
		Вопросы и задачи	677
		Анализ экспериментальных данных	680
		Предметно-именной указатель	683

Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программ Adobe Reader версии не ниже 11-й либо Adobe Digital Editions версии не ниже 4.5 для платформ Windows, Mac OS, Android и iOS; экран 10"

Учебное электронное издание

Серия: «Лучший зарубежный учебник»

Нельсон Дэвид, Кокс Майкл

ОСНОВЫ БИОХИМИИ ЛЕНИНДЖЕРА

В трех томах

Том 1

ОСНОВЫ БИОХИМИИ, СТРОЕНИЕ И КАТАЛИЗ

Ведущий редактор канд. хим. наук *Т. И. Почкаева*. Редактор канд. биол. наук *Т. Е. Толстихина*

Художник *В. А. Прокудин*. Технический редактор *Т. Ю. Федорова*. Корректор *Д. И. Мурадян*

Компьютерная верстка: *Т. Э. Внукова*

Подписано к использованию 17.12.19.

Формат 180×250 мм

Издательство «Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272, e-mail: info@pilotLZ.ru, <http://www.pilotLZ.ru>

Периодическая система элементов

1 H 1.008																	2 He 4.003				
3 Li 6.94	4 Be 9.01															5 B 10.81	6 C 12.011	7 N 14.01	8 O 16.00	9 F 19.00	10 Ne 20.18
11 Na 22.99	12 Mg 24.31															13 Al 26.98	14 Si 28.09	15 P 30.97	16 S 32.06	17 Cl 35.45	18 Ar 39.95
19 K 39.10	20 Ca 40.08	21 Sc 44.96	22 Ti 47.90	23 V 50.94	24 Cr 52.00	25 Mn 54.94	26 Fe 55.85	27 Co 58.93	28 Ni 58.71	29 Cu 63.55	30 Zn 65.37	31 Ga 69.72	32 Ge 72.59	33 As 74.92	34 Se 78.96	35 Br 79.90	36 Kr 83.30				
37 Rb 85.47	38 Sr 87.62	39 Y 88.91	40 Zr 91.22	41 Nb 92.91	42 Mo 95.94	43 Te 98.91	44 Ru 101.07	45 Rh 102.91	46 Pd 106.4	47 Ag 107.87	48 Cd 112.40	49 In 114.82	50 Sn 118.69	51 Sb 121.75	52 Te 126.70	53 I 126.90	54 Xe 131.30				
55 Cs 132.91	56 Ba 137.34	57-70 *	71 Lu 174.97	72 Hf 178.49	73 Ta 180.95	74 W 183.85	75 Re 186.2	76 Os 190.2	77 Ir 192.2	78 Pt 195.09	79 Au 196.97	80 Hg 200.59	81 Tl 204.37	82 Pb 207.19	83 Bi 208.98	84 Po (209)	85 At (210)	86 Rn (222)			
87 Fr (223)	88 Ra 226.03	89-102 **	103 Lr 262.11	104 Rf 261.11	105 Db 262.11	106 Sg 263.12	107 Bh 264.12	108 Hs 265.13	109 Mt 268	110 Uun 269	111 Uuu 272	112 Uub 277	114 Uuq 289	116 Uuh 289	118 Uuo 293						

57 La 138.91	58 Ce 140.12	59 Pr 140.91	60 Nd 144.24	61 Pm 144.91	62 Sm 150.36	63 Eu 151.96	64 Gd 157.25	65 Tb 158.93	66 Dy 162.50	67 Ho 164.93	68 Er 167.26	69 Tm 168.93	70 Yb 173.04
89 Ac 227.03	90 Th 232.04	91 Pa 231.04	92 U 238.03	93 Np 237.05	94 Pu 244.06	95 Am 243.06	96 Cm 247.07	97 Bk 247.07	98 Cf 251.08	99 Es 252.08	100 Fm 257.10	101 Md 258.10	102 No 259.10

*Лантаноиды

**Актиноиды

Принятые аббревиатуры аминокислот

A	Ala	Аланин	N	Asn	Аспарагин
B	Asx	Аспарагин или аспарагиновая кислота	P	Pro	Пролин
C	Cys	Цистеин	Q	Gln	Глутамин
D	Asp	Аспарагиновая кислота	R	Arg	Аргинин
E	Glu	Глутаминовая кислота	S	Ser	Серин
F	Phe	Фенилаланин	T	Thr	Треонин
G	Gly	Глицин	V	Val	Валин
H	His	Гистидин	W	Trp	Триптофан
I	Ile	Изолейцин	X	–	Неизвестная или нестандартная аминокислота
K	Lys	Лизин	Y	Tyr	Тирозин
L	Leu	Лейцин	Z	Glx	Глутамин или глутаминовая кислота
M	Met	Метионин			

Обозначения Asx и Glx используют при описании результатов аминокислотного анализа, когда невозможно отличить Asp и Glu от их амидных форм Asn и Gln.

Стандартный генетический код

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	Стоп	UGA	Стоп
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	Стоп	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	Ile	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg
AUG	Met*	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

* Кроме того, с AUG начинается синтез белка.

Сокращения размерностей (единиц измерения) и некоторых других параметров

А	ампер	кДж	килоджоуль
Å	ангстрем	кПа	килопаскаль
атм	атмосфера	л	литр
Бк	беккерель	М	молярная концентрация
Кл	кулон	м	метр
°С	градус Цельсия	мг	миллиграмм
кал	калория	мин	минута
Ки	кюри	мл	миллилитр
см	сантиметр	мм	миллиметр
срм	число копий в минуту	мм рт. ст.	миллиметр ртутного столба
Да	дальтон	моль	моль
дм	дециметр	мВ	милливольт
расп./мин (dpm)	распадов в минуту	мкм	микрометр
расп./с (dps)	распадов в секунду	мкмоль	микромоль
F	фарадей	н.	нормальность (экв./л)
Гс	гаусс	нм	нанометр
г	грамм	Па	паскаль
ГБк	гигабеккерель	об.	оборот
ч	час	S	единица Сведберга
Дж	джоуль	с	секунда
К	кельвин	В	вольт
ккал	килокалория	г.	год

Перевод единиц измерения

Длина	1 см = 10 мм = 10 ⁴ мкм = 10 ⁷ нм = 10 ⁸ Å = 0,394 дюйма 1 ярд = 0,9144 м 1 миля = 1,609 км
Масса	1 г = 10 ⁻³ кг = 10 ³ мг = 10 ⁶ мкг = 3,53 · 10 ⁻² унций 1 унция = 28,3 г
Температура	°C = 5/9 (°F – 32) K = °C + 273
Энергия	1 Дж = 10 ⁷ эрг = 0,239 кал 1 кал = 4,184 Дж
Давление	1 торр = 1 мм рт. ст. = 1,32 · 10 ⁻³ атм = 1,333 · 10 ² Па 1 атм = 758 торр = 1,01 · 10 ⁵ Па
Радиоактивность	1 Ки = 3,7 · 10 ¹⁰ расп./с (dps) = 37 ГБк 1 000 расп./мин (dpm) = 16,7 Бк

Некоторые физические постоянные и размерности

Атомные единицы массы (а. е. м. или дальтоны)	1,661 · 10 ⁻²⁴ г
Число Авогадро <i>N</i>	6,022 · 10 ²³ моль ⁻¹
Беккерель (Бк)	1 расп./с
Постоянная Больцмана k	1,381 · 10 ⁻²³ Дж/К = 3,298 · 10 ⁻²⁴ кал/К
Кюри (Ки)	3,70 · 10 ¹⁰ расп./с
Электронвольт (эВ)	1,602 · 10 ⁻¹⁹ Дж = 3,828 · 10 ⁻²⁰ кал
Число Фарадея <i>F</i>	96,480 Дж/(В · моль)
Газовая постоянная <i>R</i>	8,315 Дж/(моль · К) = 1,987 кал/(моль · К)
Постоянная Планка <i>h</i>	6,626 · 10 ⁻³⁴ Дж · с; 1,584 · 10 ⁻³⁴ кал · с
Скорость света (в вакууме) <i>c</i>	2,998 · 10 ¹⁰ см/с

При изучении биохимии читатель сможет легко убедиться в достоинствах этого учебника, который получил особое признание у специалистов за систематичность изложения материала. Здесь приведены определения всех основных терминов и краткое описание наиболее важных экспериментальных методов. Особо следует отметить великолепные иллюстрации, внимательное изучение которых дает возможность полнее понять суть описываемых процессов.

В томе 1 рассмотрены основы биохимии, связь строения биомолекул с их реакционной и каталитической активностью, строение и функции биомембран, механизмы биосигнализации.

Для студентов биологических, химических и медицинских вузов, а также научных работников.