

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
САМАРСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ

**Ю.П. Фролов М.М. Серых О.Н. Макурина
Н.А. Кленова В.Г. Подковкин**

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

Под редакцией профессора Ю.П. Фролова

Учебное пособие для вузов

Издательство «Самарский университет»
2004

УДК 577.1
ББК 28.072
Ф 911

Фролов Ю.П., Серых М.М., Макурина О.Н., Кленова Н.А., Подковкин В.Г. Биохимия и молекулярная биология: Учебное пособие для вузов / Под ред. Ю.П. Фролова. Самара: Издательство «Самарский университет», 2004. 501 с.

ISBN 5-86465-296-2

Пособие предназначено для студентов университетов специальности "Биология". В нем излагаются на современном уровне сведения о структуре и функциях белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, гормонов, их синтезе и распаде, регуляции метаболизма. Рассматриваются вопросы молекулярной биологии и эволюционной биохимии.

Пособие соответствует учебной программе государственных университетов РФ, а также может быть использовано студентами педагогических, медицинских и сельскохозяйственных вузов.

УДК 577.1
ББК 28.072

Рецензенты: доктор медицинских наук Л.Т. Волова
(Самарский государственный
медицинский университет),
профессор В.М. Астафьев
(Самарский государственный
педагогический университет)

ISBN 5-86465-296-2

© Фролов Ю.П.,
Серых М.М.,
Макурина О.Н.,
Кленова Н.А.,
Подковкин В.Г., 2004
© Издательство «Самарский
университет», 2004

ПРЕДИСЛОВИЕ

Отечественные авторы нечасто радуют студентов-биологов университетов учебниками по биохимии. Из университетских учебников следует назвать "Биохимию" Д.Г. Фердмана (1962) и замечательную книгу "Основы биохимии", написанную под редакцией А.А. Анисимова коллективом авторов (1986). Заслуженную известность получили однотомное (Биохимия, 1976) и трехтомное (Основы биохимии, 1985) учебные пособия А. Ленинджера, вылученные в русском переводе издательством "Мир". В связи с недостаточным тиражом этих книг студентами университетов использовались учебники с одноименным названием ("Биологическая химия"), написанные для медицинских вузов (Збарский Б.И., Иванов И.И., Мардашев С.Р., 1972; Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 1983; Николаев А.Я., 1989; Добрынина В.И., 1976, и др.). В последние годы появилось переводное издание книги В. Эллиот и Д. Эллиот "Биохимия и молекулярная биология" (1999), рекомендованной в качестве учебного пособия опять же для вузов медицинского профиля, а также учебники "Биологическая химия" для студентов химических, биологических и медицинских специальностей высших учебных заведений (Д.Г. Кнорре и С.Д. Мызина, 2000) и для студентов-медиков (Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф., 2002). К сожалению, новый учебник по биохимии для студентов-биологов государственных университетов так и не появился.

Настоящее учебное пособие написано в соответствии с требованиями Основной образовательной программы для студентов-биологов государственных университетов. В его основу положены конспекты лекций по биохимии, читаемых в течение многих лет профессорами кафедры биохимии Самарского государственного университета студентам биологического факультета.

В целом расположение материала в книге традиционное: в первом разделе даются сведения о строении, химических свойствах и классификации основных веществ, входящих в состав живых организмов (статическая биохимия), во втором – описаны химические превращения этих веществ в процессе жизнедеятельности (динамическая биохимия).

Однако в порядке изложения материала настоящее издание имеет определенные особенности. С 1988 года университетская дисциплина "Биологическая химия" стала именоваться "Биологической химией и молекулярной биологией". Это вызвано, вероятно, тем обстоятельством, что с середины прошлого века наряду с традиционными исследованиями строения биомолекул и деталей протекания метаболических процессов все больший вес стали набирать работы,

посвященные механизмам функционирования биологических макромолекул, составляющих основу всех живых систем. Новый раздел науки, «отпочковавшийся» от биохимии, получил название «молекулярная биология». Однако в подавляющем большинстве учебных пособий по биохимии молекулярная биология не выделена в самостоятельный раздел, она «растворена» в материале этих книг. В связи с этим в сознании студентов складывается однобокое представление о молекулярной биологии лишь как о науке, изучающей строение и функции нуклеиновых кислот, а также процессы реализации заложенной в них генетической информации. Авторы настоящей книги сочли целесообразным расширить объем материала о молекулярной биологии, выделив его в специальный третий раздел – «Элементы молекулярной биологии».

Существенным пробелом в преподавании биологии авторы считают отсутствие в учебных пособиях или недостаточный объем материала по вопросам происхождения жизни на Земле, в изучение которых важный вклад внесли отечественные ученые, прежде всего академик А.И. Опарин и его последователи. Начальный этап становления жизни непосредственно связан с молекулярным уровнем, относящимся к компетенции биохимии. На этом этапе протекали существенные процессы, во многом определившие всю дальнейшую биологическую эволюцию. Студенты-биологи, прежде всего обучающиеся в госуниверситете и получающие фундаментальные знания по своему профилю, должны иметь более детальное представление о возможных сценариях возникновения жизни на Земле и ее эволюции на молекулярном уровне, лежащем в основе всех проявлений жизни. В связи с этим был написан четвертый раздел – «Избранные главы эволюционной биохимии», призванный восполнить пробел в сведениях о самом раннем этапе эволюции живого на нашей планете.

Все замечания о недостатках книги и предложения по ее улучшению будут с благодарностью приняты авторами по адресу: 443011, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1, госуниверситет, кафедра биохимии.

ВВЕДЕНИЕ

Современная биохимия находится на перекрестке многих естественных наук – органической химии, физической химии, физиологии, генетики, иммунологии, микробиологии, вирусологии и др. В то же время биохимия является одной из теоретических основ медицины, сельского хозяйства, биотехнологии, генетической инженерии, ряда отраслей промышленности. Помимо собственных фундаментальных и прикладных задач, она решает вопросы, необходимые для понимания всей совокупности явлений жизни.

Биологическая химия (биохимия) – это наука, изучающая химический состав живых организмов, химические процессы, лежащие в основе их жизнедеятельности, а также сущность регуляторных механизмов, ведущих к интеграции метаболических процессов в живых клетках и организмах.

Биохимия сравнительно молода, ее развитие как науки приходится в основном на XX век, хотя накопление фактического материала о составе живых организмов происходило в течение многих столетий.

Название «химия» произошло от одной из провинций Египта, где была хорошо налажена технология мумификации. В арабских странах возникла алхимия (*ал* – арабская приставка).

Крупнейшим представителем алхимиков был Авиценна (Абу Али Ибн-Син, X-XI вв.) – автор «Канона врачебной науки», в одном из разделов которого он подробно описал многие лекарственные вещества.

С приходом арабов в Европу произошло распространение и развитие работ по алхимии и в Европе (до XVI в.).

Алхимики, наряду с попытками изобрести «философский камень» и «жизненный эликсир» для возвращения молодости, пытались также получить «панацею» – лекарство от всех болезней, создать живые организмы, в том числе человека («гомункулуса») из химических элементов. Научных материалов было мало. Можно указать лишь на опыты Леонардо да Винчи (1452-1519), позволившие ему сделать вывод о том, что существование живого организма возможно лишь в такой атмосфере, в которой может гореть пламя.

XVI-XVII вв. – период возникновения и развития *ятрохимии* (*iatros* – по гречески врач). Наиболее известные ятрохимики Парацельс (1493-1541) и Ван Гельмонт (1577-1644). Парацельс призывал химиков отказаться от поисков философского камня и служить медицине – изучать страдания человека и изыскивать средства (прежде всего химические) для их излечения. Парацельс считал, что заболевания являются следствием нарушений в организме химических процессов, слаженность и

целесообразность которых в здоровом организме его удивляли, но были необъяснимы.

Все ятрохимики придерживались виталистического взгляда, согласно которому химическими процессами в живом организме управляет сверхъестественное, непознаваемое начало («жизненная сила»). В частности, Парацельс считал, что всеми процессами в организме управляет находящийся в желудке мудрый дух – архей.

Ван Гельмонт наблюдал увеличение веса веточки ивы, опущенной в землю и поливаемой водой, за счет уменьшения веса добавляемой воды. Эти данные позволили ему считать, что вещество растения образуется из воды. Ван Гельмонт впервые высказал предположение о наличии в соках живого тела особых веществ – «ферментов», принимающих участие в химических превращениях. Наряду с этим он же считал (явно ненаучно), что мыши являются продуктом синтеза из зерна ржи и грязного постельного белья.

Фундамент научной химии, в том числе органической и физиологической, заложен в XVIII в., чему способствовало открытие М.В. Ломоносовым и А. Лавуазье основных законов сохранения вещества и энергии, справедливых и для биологических объектов. Работами А. Лавуазье было показано, что дыхание живых организмов сопровождается, как и при горении органических веществ, поглощением кислорода и выделением углекислого газа.

В XVIII в. начаты работы по изучению ферментов и ферментативных процессов (К.С. Кирхгоф, Л. Спаланцани и др.). Были открыты ферменты амилаза, пепсин, трипсин, которые были отнесены к катализаторам. Понятие о катализе и катализаторах к тому времени ввел в химию Й. Берцелиус.

К началу XIX в. были открыты и описаны многие органические вещества: мочевины, мочевины, щавелевая, молочная, лимонная и другие органические кислоты, аспарагин, холестерин, лецитин и др. В то же время один из наиболее известных ученых – химик Й. Берцелиус, придерживавшийся виталистических взглядов, считал, что синтез органических веществ, входящих в состав живой материи, принципиально невозможен. Ученик Й. Берцелиуса Ф. Вёлер, вначале поддерживавший его взгляды, затем понявший неправильность учения Й. Берцелиуса, ушел из лаборатории своего учителя и в 1828 г. синтезировал первое органическое вещество – мочевины из неорганических веществ. Тем самым был нанесен наиболее сокрушительный удар по витализму.

Вскоре были синтезированы уксусная кислота (А. Кольбе, 1845), жиры (М. Бертло, 1854), углеводы (А. Бутлеров, 1861), что послужило стимулом последующего увлечения химиков синтезом органических

веществ, ставшего в то время одним из основных направлений в органической химии.

Параллельно накапливаются сведения о серии веществ, характерных для животных и растений, описываются их компоненты, химическое строение, формулы, открываются функциональные группы.

В 1839 г. Ю. Либих, исследуя биологические системы методами количественного химического анализа, выяснил, что главными составными частями растительных и животных организмов (а следовательно, и пищи человека) являются белки, жиры и углеводы. Ф. Мишер (1878-1879) открыл ранее неизвестное вещество, выделенное им из ядра лейкоцитов и сперматозоидов, содержащее 2,5% фосфора и 14% азота, но не обладающее свойствами белка. Это было открытие ДНК, первоначально названное Ф. Мишером нуклеином. Последующие работы А.Я. Данилевского – основоположника полипептидной теории структуры белков; Э. Фишера, сформулировавшего основные положения полипептидной теории белков, установившего структуру и свойства большинства аминокислот, входящих в белки; Л. Пастера и Ю. Либиха – о природе брожения, К.А. Тимирязева – о фотосинтезе; М.В. Ненцкого – по биосинтезу мочевины в печени; Н.И. Лукина и К. Эйкмана – о дополнительных факторах питания (витаминах) и другие работы привели к возникновению биологической химии, которую вначале называли физиологической химией.

Биохимию в настоящее время, до некоторой степени условно, делят на статическую, динамическую и функциональную.

Статическая биохимия имеет целью изучить химический состав живых организмов, структуру входящих в них веществ.

Динамическая биохимия изучает превращения всех веществ со времени их поступления в организм, через все промежуточные стадии, до образования конечных продуктов, подлежащих выведению из организма. Она является более молодой ветвью биохимии, с массой гипотез, теорий, требующих доказательств.

Статическая и динамическая ветви биохимии являются составными частями **общей биохимии**, изучающей преимущественно общие закономерности структуры и обмена веществ, характерные для человека, животных, растений и микроорганизмов.

Функциональная биохимия изучает химические реакции, происходящие в процессе проявления функций различных клеток, органов, тканей, а также целого организма (при развитии, размножении, нервной деятельности, фотосинтезе, особенности обмена веществ в мышечной ткани, мозге, печени, почках, в различных частях растений и т.д.).

Биохимия – наука биологическая, выявляет с помощью различных методов биологические явления, биологические закономерности, жизненные явления (происхождение и сущность жизни, вопросы старения, роста, размножения и т.д.).

Особенно большие успехи в области биохимии достигнуты в XX веке, что связано с успехами в химии и физике, методы которых широко применяются в биологии, в том числе в биохимии.

Можно выделить несколько периодов, связанных с методиками, обусловившими прогресс в биохимии.

Первый период (1930-1940 гг.) характеризуется переходом от изучения значения тех или иных (в том числе пищевых) веществ путем введения их в организм и наблюдения за поведением и здоровьем животных, к изучению химической природы и механизма действия веществ, содержащихся в организме в очень малых количествах, но совершенно ему необходимых (витаминов, гормонов, стимуляторов и т.д.). Этому способствовали работы по конструированию и усовершенствованию аналитических весов, разработка методов полумикроанализа и микроанализа, с помощью которых были выделены и изучены витамины, гормоны и другие соединения. В чистом виде изучение витаминов позволило расширить представление о структуре и механизме действия ферментов, в состав которых входят витамины. Выделение в чистом виде цитруллина способствовало открытию Г.Кребсом (1933) орнитинового цикла образования мочевины. В этот же период Г. Кребс открыл основные реакции цикла трикарбоновых кислот (1937); В.А. Энгельгардт – сопряжение реакций фосфорилирования с окислительными процессами (1931), а позднее (совместно с М.Н. Любимовой) – АТФ-азную активность миозина; А.Е. Браунштейн и М.Г. Крицман – реакции трансаминирования (1938).

Второй период привел нас к современности, открыл новые возможности и перспективы. Это довоенные и, главным образом, послевоенные годы. В этот период появляется целый ряд очень точных методических приемов, позволивших проводить тончайшие анализы, в том числе *по перемещению меченых атомов* в организме и трансформации в нем одних веществ в другие.

Очень ценным оказался метод дифференциального центрифугирования – с его помощью разделены составные части клеток и даже отдельные молекулы. Строение отдельных молекул (например, ДНК) можно изучать и *методами электронной микроскопии*. В изучении структуры белков и ДНК сыграли большую роль *рентгеноструктурный анализ*, специальные методы *секвенирования* (определение последовательности нуклеотидов в ДНК и аминокислот в белках), *клонирования генов*, кодирующих ферментные и другие белки, *исполь-*

зование набора ферментов с известной специфичностью (нуклеаз, пептидгидролаз, гликозидаз), различные хроматографические и спектроскопические методы.

Настоящий переворот в области биохимии липидов произошел после введения в практику газожидкостной и тонкослойной хроматографии.

Для определения содержания гормонов и других биологически активных веществ в организме используют радиоиммунологические методы исследования, сочетающие в себе специфичность иммунологической реакции с высокой чувствительностью радиоизотопного анализа, позволяющие измерять очень малые количества вещества в биологических системах.

Все эти методы позволили произвести важнейшие открытия в биохимии, а следовательно, в биологии вообще.

Большие успехи достигнуты в изучении обмена различных веществ, в изучении структуры и функций белков и нуклеиновых кислот.

Возникла **молекулярная биология**, исследующая проявления жизни на молекулярном уровне – роль белков и нуклеиновых кислот в росте и развитии органов и тканей, в трансформации энергии, конформационные изменения молекул при их функционировании, механизмы биологического «узнавания» и межклеточные взаимодействия, регуляцию активности генов, синтеза белка и т.д.

Главными достижениями второго периода являются:

- установление структуры нуклеиновых кислот, первичной и других структур многих белков;

- открытие информационной роли ДНК, расшифровка генетического кода и механизма передачи информации от ДНК к белку;

- выявление таксономического и эволюционного значения количественного соотношения отдельных азотистых оснований мононуклеотидов в ДНК;

- доказательство сходства структуры мобильных (подвижных) диспергированных генов со структурой ДНК-содержащего провируса, образовавшегося с участием обратной транскриптазы на цепи РНК ретровируса (проникшего в клетку);

- выделение главных органелл клеток, установление их функций;

- получение в очищенном виде многих ферментов и изучение механизмов регуляции их активности;

- изучение структуры и механизма действия главных гормонов, получение некоторых гормонов синтетически;

- достижение существенных успехов в изучении структуры и функции мембран;

- изучение формы запасаения, трансформации и использования энергии.

Существенный вклад в эти достижения внесли Х. Френкель-Конрат, Э. Чаргафф, М. Уилкинс, Р. Франклин, Д. Уотсон, Ф. Крик, М. Ниренберг, С. Очоа, А.Н. Белозерский, А.С. Спириин, П. Митчел, В.П. Скулачев, А.А. Баев, Р. Холли, Г. Корана, Г.П. Георгиев, Ф. Жакоб, Ж. Моно, С.Е. Северин, Ф. Сэнгер, Ю.А. Овчинников, В.Л. Кротович, И.В. Березин и многие другие, о работах которых сообщается в соответствующих разделах данного учебного пособия.

Во второй половине XX в. положено начало **современному периоду**, являющемуся закономерным продолжением предыдущего и в то же время новым этапом в развитии биологических исследований, последствия которого трудно себе представить. Наиболее важными и приоритетными направлениями в биохимии и молекулярной биологии являются разработка методов и развитие генетической инженерии, в том числе получение трансгенных животных (с передачей новой генетической информации потомству), а также развитие иммунологической инженерии (без передачи новой генетической информации потомству).

Крупнейшими достижениями в последние десятилетия являются:

- открытие в нервной, эндокринной и иммунной системах общих медиаторов, гормонов, цитокинов и рецепторов к ним, обеспечивающих на молекулярном уровне общность каскадных механизмов передачи регуляторных сигналов, свидетельствующих о наличии в организме человека и животных единой нейроэндокринноиммунной системы регуляции метаболизма, гомеостаза, адаптационных процессов и резистентности;

открытие процессов перестройки «разорванных» интронами генов иммуноглобулинов и рецепторов цитотоксических лимфоцитов на разных стадиях (антигеннезависимых и антигензависимых) дифференцировки лимфоцитов;

выявление молекулярных механизмов действия цитотоксических лимфоцитов, естественных киллеров и фагоцитов;

открытие конкуренции за одни и те же рецепторы некоторых нейропептидов (эндорфинов и энкефалинов) и наркотических веществ, а также диоксинов и некоторых гормонов за Rh-рецепторы;

почти полная расшифровка генотипа человека, включая определение количества генов, их функции в организме, количества генов, вовлеченных в развитие и функционирование отдельных органов и тканей;

получение методами генетической инженерии инсулина, интерферонов, соматотропина человека;

производство биотехнологическими методами моноклональных и поликлональных антител, ферментов, биоактивных пептидов, простагландинов – в медицине, ферментов – для борьбы с вредителями растений, пищевых и вкусовых добавок – в промышленности.

В настоящее время перед биохимией стоят ответственные задачи и среди них:

- использование данных о структуре генома человека с целью профилактики, диагностики и лечения наследственных заболеваний;

- исследование молекулярно-биологических механизмов канцерогенеза; разработка методов диагностики и лечения опухолевых заболеваний людей;

- получение принципиально новых пород животных, форм растений с ценными продуктивными признаками;

- исследование особенностей обмена веществ, процессов регуляции гомеостаза, адаптации и резистентности у организмов, полученных путем трансплантации эмбрионов, клонирования и у трансгенных животных;

- разработка научных основ инженерной энзимологии, внедрение новых биокатализаторов (в том числе иммобилизованных);

- изучение генетики микроорганизмов и вирусов, вызывающих заболевания человека и животных, создание методов и средств их диагностики, лечения и профилактики;

- изучение заболеваний, вызываемых прионными белками, создание методов и средств их диагностики, лечения и профилактики;

- исследование проблем биоэнергетики, питания, психики, молекулярных основ памяти и деятельности мозга;

- изучение влияния экологических факторов, в том числе антропогенных, на процессы обмена веществ и механизмы их регуляции; разработка мер профилактики и лечения заболеваний, вызываемых неблагоприятными факторами внешней среды.

РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ

СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ БИМОЛЕКУЛ

Особенности химического состава организмов

Эволюция живых систем происходила в земных условиях, и поэтому не вызывает особого удивления тот факт, что в их составе нет ни одного химического элемента, который бы не встречался в неживой природе. Однако живые организмы обладают избирательностью по отношению к различным химическим элементам, процентное содержание которых в биомассе и окружающей среде может существенно (на порядки как в одну, так и в другую стороны) различаться. Об этом свидетельствуют обобщенные данные В.И. Вернадского [Вернадский В.И. Биосфера. М.: Мысль, 1967. С. 47, 145, 147], представленные в таблице.

Особенности избирательного накопления различных химических элементов *живым веществом* (термин, предложенный В.И. Вернадским) обусловлены в первую очередь, по-видимому, спецификой жизненных процессов, поскольку в *целом* содержание ни одного из них в окружающей среде нельзя считать лимитирующим для наращивания биомассы. Тем не менее, определенное влияние на избирательность использования организмами отдельных химических элементов могла оказать фактическая доступность их для включения в жизненный процесс (например, плохая растворимость в воде).

Обращает внимание и большой разброс (опять же на многие порядки) в содержании различных химических элементов в живом веществе, захватывающий не менее 7 декад в таблице (от кислорода и водорода первой декады до кобальта и молибдена седьмой декады).

Еще в XIX веке наш академик К.М. Бэр (1792-1876) вывел важное обобщение, которое назвал «правилом бережливости» и показал его справедливость применительно к углероду и азоту. Суть этого обобщения состоит в том, что раз попав в живое вещество, те же атомы непрерывно в течение миллионов лет остаются в жизненном цикле. Живое вещество прочно удерживает вошедшие в него химические элементы, которые мигрируют по трофическим цепям из одного организма в другой. Создается особый, присущий живой материи путь перемещения элементов, именуемый биотическим круговоротом.

Среднее (процентное) содержание химических элементов в живом веществе, гидросфере и земной коре (фрагмент).

Жирным шрифтом выделены химические элементы, встречающиеся в живом веществе

Декады	Весовой %	Химические элементы		
		Живое вещество	Гидросфера	Земная кора
I	≥ 10	O, H	O, H	O, Si
II	1 - 10	C, N, Ca	Cl, Na	Al, Fe, Ca, Na, K, Mg, H
III	10^{-1} -1	S, P, Si, K	Mg	Ti, C, Mn, Cl, S, P
IV	10^{-2} - 10^{-1}	Mg, Fe, Na, Cl, Al, Zn	S, Ca, K	N, Ba, B, V, Li, Ni, Cr, Zr, Br, Cu, F
V	10^{-3} - 10^{-2}	Cu, Br, I, Mn, B	C, Br, N	Be, I, Sn, Co, Th, U, Zn, Pb, Mo, Rb, V, Ce
VI	10^{-4} - 10^{-3}	As, F, Pb(?), Ti, V, Cr, Ni, Sr, Li	Si, Rb(?), Fe	Ar, W, Cs, Bi, Cd, Hg, Hf, Nd, Sm, Gd, Yb, Pr
VII	10^{-5} - 10^{-4}	Ag, Co, Ba, Rb(?), Sn, Mo	P, F, I, B, Ar, Cu, Ag, U	La, As, Nb, Sb, Ag, Se, Te, Tl, Eu, Er, Dy, Ta, Ho, Tm
VIII	10^{-6} - 10^{-5}	Au(?)	Li, Th(?), As	Au, Pt, Ge, In, Os, Ir, Ga
IX	10^{-7} - 10^{-6}	Hg	Zn	He, Re, Ru, Rh, Pd

Биотический круговорот вовлекает в свою орбиту колоссальное количество необходимых для жизнедеятельности химических элементов, пропуская их со значительной скоростью через структуры живого вещества, масса которого на Земле, по оценкам В.И. Вернадского, составляет 10^{12} т. Согласно расчетам американского ученого Е. Рабиновича, весь кислород атмосферы оборачивается через организмы примерно за 2000 лет, углекислота (содержит элементы первой и второй декады – O и C) совершает полный цикл за 300 лет, а вся вода океанов, морей и рек (содержит элементы первой декады – O и H) разлагается и восстанавливается в биотическом круговороте за 2 миллиона лет. Очевидно, что за время биологической эволюции

не только углекислота и кислород, но и вся вода прошли через живое вещество не одну сотню раз.

Активно функционирующая часть живой материи представлена органическими соединениями. Они содержат атом углерода (а не его «соседа» в таблице Менделеева – кремния, которого в земной коре на два порядка больше), способного давать разнообразные соединения, исчисляемые миллионами наименований.

Органические соединения разделяют на соединения с открытой цепью (алифатический, или жирный, ряд) и циклические. Последние делятся на две группы: карбоциклические соединения (циклы состоят только из атомов углерода) и гетероциклические (в циклы входят помимо углерода и другие атомы). Карбоциклические соединения, в свою очередь, включают два ряда: алициклический и ароматический.

В живой природе представлены соединения всех названных групп и рядов, однако их перечень включает достаточно ограниченное число отобранных в процессе эволюции молекул (подобно химическим элементам). Например, из многих десятков разных молекул аминокислот в состав белков входят только 20, а из множества гетероциклических соединений в состав молекул ДНК входят лишь 2 производных пурина (аденин и гуанин) и 2 производных пиримидина (цитозин и тимин).

Аминокислоты содержат карбоксильную и аминную группы у второго углеродного атома, которые выполняют роль связующих звеньев полипептидной цепи, несущей радикалы алифатической, карбоциклической и гетероциклической природы. Относительно большое разнообразие этих радикалов обусловлено множеством специфических функций, выполняемых белками, в состав которых входят аминокислотные остатки. Напротив, чрезвычайно малый набор гетероциклических соединений, входящих в состав нуклеиновых кислот, связан с их узкой специализацией (носителей генетической информации). Аналогичным образом обстоит дело и с полисахаридами, состоящими из относительно малочисленного набора остатков различных моносахаров.

Важнейшую роль в живых системах играют биомакромолекулы. Они имеют блочную структуру, то есть состоят из большого числа повторяющихся в определенном порядке остатков «строительных блоков» – аминокислот, нуклеотидов, моносахаридов и др. В качестве таких унифицированных блоков используются небольшие молекулы (аминокислоты, моносахара), а также более крупные и сложные по составу соединения (нуклеотиды). Крупные белковые молекулы,

имеющие четвертичную структуру, состоят из набора взаимосвязанных одинаковых или разных субъединиц.

Блочный характер строения макромолекул эволюционно обусловлен и дает большие преимущества организмам. Благодаря ему, в частности, в живой природе проявляется уже на уровне «строительных блоков» (а не только химических элементов) «правило бережливости». В процессе пищеварения под действием гидролаз происходит расщепление биомолекул пищи до мономеров, которые всасываются в кишечнике и без дальнейшего распада вновь включаются в построение макромолекул своего нового «хозяина», не выходя за пределы биотического круговорота. Аналогичным образом мономеры потерявших функциональную активность макромолекул, например аминокислоты «состарившихся» белков, в той же клетке после расщепления последних пептидгидролазами повторно используются при биосинтезе новых белковых молекул.

Характерной особенностью живых систем является преимущественное использование одной из форм энантиомеров (L или D). Так, в составе белков обнаружены только L-аминокислоты. Моносахариды, напротив, в живых организмах присутствуют в преобладающем большинстве случаев в D-конформации. Причина возникновения такой предпочтительности в использовании определенных форм энантиомеров и биологический смысл этого явления еще недостаточно раскрыты.

В различных организмах имеет место преобладание тех или иных химических соединений. В частности, у растений по вполне понятным причинам среди органических соединений обычно преобладают углеводы, у животных – белки. Эти различия, опять же, эволюционно обусловлены.

Все соединения, входящие в живые системы, классифицируют по химической природе и (или) функциональному признаку. Некоторые группы соединений состоят из химически близких веществ (белки, углеводы, нуклеиновые кислоты), другие, напротив, объединяют химически разнородные молекулы (витамины, гормоны, в определенной мере – липиды). В настоящем разделе, посвященном статической биохимии, даются сведения о химическом составе, свойствах, биологических функциях и локализации основных групп химических соединений, входящих в состав живых организмов.

ГЛАВА ПЕРВАЯ БЕЛКИ

1.1. Общая характеристика

Белки представляют собой особый класс биомолекул, для которого характерны самые разнообразные функции. Пожалуй, белки могут делать все, кроме одного — воспроизводить сами себя. С середины XVIII века проявился особый интерес к веществам, характерным для различных организмов и сходным по свойствам. Выделенные из различных биологических объектов вещества содержали азот и имели некоторые свойства, характерные для яичного белка. Этим веществам дали название — *белки*.

Термин *белковый* (*albumineise*) по аналогии с яичным белком был впервые использован французским физиологом Ф. Кене (1747 г.) в отношении всех жидкостей животного происхождения. В таком толковании этот термин в 1751 г. вошел в «Энциклопедию» Д. Дидро и Ж. Д'Аламбера.

В 1838 г. голландский химик Г. Мульдер впервые на основе своих многочисленных исследований пришел к заключению, что белкам присущи разнообразные функции и что все они содержат азот. Эти соединения он назвал *протеинами*. Исследования большого количества легко доступных белков (казеина молока, белка яиц, белков плазмы крови, белков растений) свидетельствовали об уникальном химическом сходстве этих веществ. Более чем через 50 лет (в 1902 г.) Ф. Фишер установил, что в структуре всех белков присутствуют аминокислоты, соединенные ковалентными (*пептидными*) связями. Таким образом, соединения, имеющие пептидные связи, стали называть *пептидами*, или *полипептидами*.

Исследования выдающихся русских ученых-биологов И.М. Сеченова, А.Я. Данилевского, К.А. Тимирязева, И.П. Павлова и др. показали, что функционирование живых организмов на различных уровнях их организации зависит от разнообразных белков. Очевидно, что белки имеют первостепенное значение для жизнедеятельности организмов, поскольку, имея уникальное строение, способны не только различать другие молекулы, но и взаимодействовать с ними.

Белки (*протеины*) — это полимеры, имеющие, как правило, высокую молекулярную массу и образующие при гидролизе *аминокислоты*. Поскольку на долю белков приходится не менее половины сухого веса клетки, можно говорить о преобладающем содержании этих веществ в клетке по сравнению с другими макромолекулами (поли-

сахаридами, нуклеиновыми кислотами). В любом компартменте про- и эукариотических клеток присутствуют белки. Молекулярная масса белков колеблется от нескольких тысяч до 1 млн. и более.

1.2. Строение и свойства аминокислот

1.2.1. Определение и классификация

Аминокислотами называются производные карбоновых кислот, в которых один из атомов углеродной цепи замещен на аминогруппу. Большинство природных аминокислот имеют NH_2 -группу в α -положении по отношению к карбоксилу:



В составе белков некоторых организмов можно обнаружить аминокислоты с β - или γ -положением аминогрупп (β-аминопропионовая; γ-аминомасляная). Такие достаточно редкие аминокислоты образуются из α-аминокислот уже после завершения синтеза белков с помощью специфических ферментов.

Большинство α-аминокислот, встречающихся в живой природе, имеют L-конфигурацию. Однако встречаются белки, в состав которых входят D-аминокислоты (некоторые токсины и антибиотики, белки клеточных стенок бактерий).

Все многообразие аминокислот можно классифицировать по ряду признаков: на основе химической природы радикалов, в зависимости от количества амино- и карбоксильных групп, по наличию или отсутствию заряда, по питательной ценности для человека и пр. Часто используют трехбуквенное обозначение аминокислот (Гли, Ала, Тре и т.д.). Ниже приведены полные названия аминокислот, молекулярные массы в дальтонах (Да), сокращенные названия аминокислот, а также структурные формулы их радикалов.

Алифатические

Глицин	57	Гли	—H
Аланин	71	Ала	—CH_3
Валин	99	Вал	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{—CH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Лейцин	113	Лей	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{—CH}_2\text{—CH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Изолейцин	113	Иле	$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{—CH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_2\text{—CH}_3 \end{array}$

Гидроксиаминокислоты

Серин	87	Сер	$\begin{array}{c} \text{—CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Треонин	101	Тре	$\begin{array}{c} \text{—CH—CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$

Дикарбоксильные

Аспарагино- вая кислота	114	Асп	$\text{—CH}_2\text{—COOH}$
-------------------------------	-----	-----	----------------------------

Глутаминовая кислота	128	Глу	$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—COOH}$
----------------------	-----	-----	--

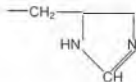
Амиды дикарбоксильных аминокислот

Аспарагин	114	Асн	$\text{—CH}_2\text{—CONH}_2$
-----------	-----	-----	------------------------------

Глутамин	128	Глн	$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CONH}_2$
----------	-----	-----	--

Аминокислоты с катионообразующими группами в боковых цепях

Гистидин	137	Гис	
----------	-----	-----	--






Лизин	129	Лиз	$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_2$
-------	-----	-----	--

Аргинин	157	Арг	$\text{—(CH}_2\text{)}_2\text{—HN—C(=NH)—NH}_2$
---------	-----	-----	---

Серосодержащие аминокислоты

Цистеин	103	Цис	$\text{—CH}_2\text{—SH}$
Метионин	131	Мет	$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—SH—CH}_3$

Ароматические аминокислоты

Фенилаланин	147	Фен	$\text{—CH}_2\text{—}$ 
Тирозин	163	Тир	$\text{—CH}_2\text{—}$ 
Триптофан	186	Три	$\text{—CH}_2\text{—}$ 

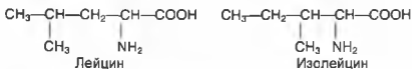
Иминокислота

Пролин	97	Про	
--------	----	-----	---

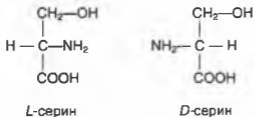
1.2.2. Изомерия аминокислот

Изомерами называются соединения, имеющие одинаковую молекулярную формулу, но отличающиеся расположением атомов в пространстве, а также природой и последовательностью связей между ними. Выделяют два вида изомеров: структурные и стереоизомеры.

Структурные изомеры (в соответствии с новыми правилами международной номенклатуры их рекомендуется называть *конститутивными*) имеют различную последовательность связывания атомов. Например, лейцин и изолейцин, молекулярные формулы которых одинаковы – $C_6H_{13}O_2$, а структурные – отличаются.



Стереоизомерами называются изомеры с одинаковой последовательностью атомов, но с различным их расположением в пространстве. Примерами могут служить стереоизомеры серина:



Существует два вида стереоизомеров: *энантимеры* (изомеры, которые относятся друг к другу как предмет и его зеркальное изображение) и *диастереоизомеры* (изомеры, которые не относятся друг к другу как предмет и его зеркальное изображение). Диастереоизомерами являются *цис-транс*-изомеры, если они отличаются только расположением атомов относительно плоскости, проходящей че-

рез молекулу (возможна только в структурах, которым придает жесткость двойная связь или цикл).

Для многих молекул характерно наличие основных элементов симметрии: плоскости симметрии, центра симметрии, оси симметрии. Если же молекула не имеет ни центра симметрии, ни плоскости симметрии, то она *хиральна* и может существовать в виде пары энантиомеров.

Хиральностью называется свойство соединений существовать в виде пары не совместимых между собой зеркальных изображений. Такие соединения называются *дисимметричными*. Хиральные молекулы, не имеющие оси симметрии, называются *асимметричными*. Таким образом, асимметричная молекула всегда хиральна, но не всякая хиральная молекула асимметрична.

Ахиральными называются молекулы, которые не имеют энантиомеров. Все хиральные молекулы содержат атом (или атомы), вокруг которого размещаются четыре различных атома или функциональные группы. Такой атом называется *хиральным атомом* или *хиральным центром*. Хиральными могут быть атомы углерода, фосфора, азота, кремния и др. Если в соединении содержится n хиральных атомов, оно может существовать в количестве 2^n стереоизомеров.

Хиральные соединения способны вращать плоскость поляризованного света, то есть они обладают *оптической активностью*. Энантиомер, вращающий плоскость поляризации по часовой стрелке, называется *правовращающим* (его обозначают знаком «+»), против часовой стрелки – *левовращающим* (обозначают «-»).

Конформации молекулы (различные расположения атомов молекулы в пространстве, возникающие в результате вращения вокруг одинарных связей) можно рассматривать как частный случай стереоизомерии.

1.2.3. Стереохимия аминокислот

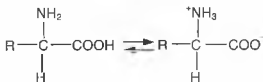
Все наиболее часто встречающиеся в белках аминокислоты (стандартные аминокислоты), кроме глицина, обладают оптической активностью и существуют в виде пары энантиомеров – *D* и *L*, так как имеют хиральный атом углерода (у которого атом водорода замещен на аминогруппу). Как правило, *D*-изомеры аминокислот обладают сладким вкусом, а *L*-формы – безвкусные или горькие.

Большинство белков состоят из *L*-аминокислот. *D*-аминокислоты встречаются в составе пептидов и белков достаточно редко (напри-

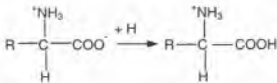
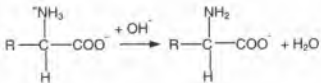
мер, в составе антибиотиков грамицидина и актиномицина, в составе белков растений).

1.2.4. Ионизация аминокислот

В водных растворах большинство аминокислот существуют в основном в виде биполярных ионов или *цвиттерионов* с протонированной аминогруппой ($\text{—}^+\text{NH}_3$) и диссоциированной карбоксильной группой (—COO^-):



Биполярные ионы аминокислот хорошо растворимы в воде, плохо растворяются в органических растворителях, имеют высокие значения диэлектрических постоянных и температуры плавления. Условия среды (pH) определяют форму молекул аминокислот (анионы, катионы, электронейтральные биполярные ионы). При $\text{pH} < 7$ аминокислоты имеют вид положительно заряженных ионов, а при $\text{pH} > 7$ — присутствуют в растворах в виде отрицательно заряженных ионов. Таким образом, аминокислоты представляют собой амфотерные электролиты:



Поскольку аминокислоты являются амфотерными соединениями, то они в зависимости от состава раствора могут образовывать различные соли, взаимодействуя как с основаниями, так и с кислотами.

Согласно теории кислот и оснований Бренстеда, *кислотой* называются те вещества, которые способны отдать протон (COOH- и H_3N^+ -группы аминокислот), а *основанием* — те, которые способны связать протон (группы COO^- и NH_2).

Константы диссоциации карбоксильной (K_1) и аминной групп (K_2) или их отрицательные логарифмы ($\text{p}K_1$ и $\text{p}K_2$) численно равны концентрации водородных ионов (pH), при которой отношение диссоциированных форм к недиссоциированным равно единице, то есть 50% аминокислоты находится в виде диполей, а 50% в виде катионов и анионов.

Величины $\text{p}K_1$ и $\text{p}K_2$ можно определить с помощью электрометрического титрования. Кривая титрования представлена на рис. 1.1.

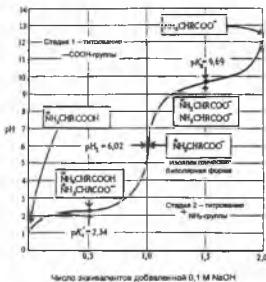


Рис. 1.1. Кривая титрования 0,1 М аланина [1].

Ионные формы, преобладающие при различных значениях pH , заключены в прямоугольные рамки. Буквой *A* обозначена метильная группа аланина. Пологие участки кривой титрования по обе стороны от точек, соответствующих величинам $\text{p}K_1' = 2,34$ и $\text{p}K_2' = 9,69$, представляют собой зоны, где аланин обладает буферной емкостью

Титрование аланина (и других моноаминомонокарбоновых кислот) носит двухстадийный характер, и поэтому кривая титрования состоит из двух четко выраженных и различающихся ветвей. Точки, где эти ветви перегибаются, соответствуют значениям pK_1 и pK_2 и равны соответственно 2,34 и 9,69. Если значение pH будет ниже pK_1 , то все нейтральные аминокислоты будут иметь положительный заряд, а при pH выше pK_2 — отрицательный. В точке перехода между ветвями молекула аминокислоты имеет суммарный заряд, равный нулю, так как число отрицательных и положительных ионов одинаково.

Значение pH , при котором суммарный заряд аминокислоты равен нулю (то есть молекула электронейтральна), называется *изоэлектрической точкой* (ИЭТ) или pI . При этом значении pH аминокислоты не перемещаются в электрическом поле. То значение pH , которое имеет водный раствор чистой аминокислоты, называется *изоионной точкой*.

Анализируя кривую титрования аланина, можно узнать о том, что он проявляет буферные свойства в двух диапазонах pH . Первая область определяется плоским участком кривой по обе стороны от точки, соответствующей pK_1 , 2,34. Следовательно, аланин обладает буферной емкостью вблизи pH 2,34. Вторая буферная зона расположена в диапазоне pH от 8,7 до 10,7. Исходя из этих данных следует, что аланин является плохим буфером при значении pH около 7,4, характерном для межклеточной жидкости и крови.

Если аминокислоты (например, лизин, гистидин, глутаминовая кислота) имеют ионизирующиеся R-группы, то их кривые титрования будут иметь более сложный характер. Это объясняется тем, что кривые, описывающие диссоциацию R-групп, накладываются на кривые диссоциации α -карбоксильных и α -аминогрупп.

Большинство аминокислот имеют близкие значения pK α -карбоксильных групп (2,1-2,3) и pK α -аминогрупп (9,1-9,6). $COOH$ -группа моноаминомонокарбоновых кислот имеют более сильную кислотность, чем карбоксильные группы соответствующих алифатических аминокислот. Это объясняется тем, что заряженные $\alpha-NH_2$ группы способствуют отталкиванию H^+ карбоксильных групп.

Амфотерность аминокислот лежит в основе принципа разделения аминокислот с помощью ионообменной хроматографии и электрофореза. Для аминокислот характерны специфические химические реакции, основой которых служит особенность строения радикала аминокислот, а также других функциональных групп (карбоксильной и аминогруппы). Поскольку все аминокислоты имеют аминогруппу (кроме

пролина, который является иминокислотой) и карбоксильную группу, то они могут вступать в химические реакции, характерные для этих группировок. Например, NH_2 -группы могут быть ацетилированы, а COOH -группы – этерифицированы.

Для качественного и количественного анализа аминокислот часто используют две наиболее характерные реакции. Первая из них – нингидриновая реакция, которую используют для выявления и точного определения только небольшого количества аминокислот. Принцип этой реакции заключается в том, что при нагревании α -аминокислот с избытком нингидрина образуется продукт реакции сине-фиолетового цвета (пурпур Рузманна), максимум поглощения которого обнаруживается при 580 нм. Интенсивность окрашивания раствора пропорциональна количеству свободных α -аминогрупп, то есть количеству α -аминокислоты. Иминокислота пролин с нингидрином дает желтое окрашивание раствора. Вторая реакция – это взаимодействие аминокислот с 1-фтор-2,4-динитробензолом (ФДНБ). Принцип этого метода заключается в том, что в слабом щелочном растворе ФДНБ реагирует с α -аминокислотами и образуется 2,4-динитрофенильные производные. Эту реакцию применяют для идентификации индивидуальных аминокислот.

Для всех без исключения аминокислот характерны реакции конденсации (поликонденсации), в результате которых образуется полимерная молекула пептида или белка.

1.3. Строение белковой молекулы

1.3.1. Полипептидное строение белков

Состав химических элементов белков к настоящему времени установлен точно: 50-55% приходится на долю углерода, 21-23% – кислорода, 15-17% – азота, около 7% – водорода и до 3% – серы. В некоторые сложные белки могут еще входить металлы и фосфор.

В 80-х годах XIX века А.Я. Данилевский (основоположник отечественной биохимии), проведя щелочной гидролиз белков, высказал идею о наличии регулярно повторяющихся в составе белков звеньев, содержащих атомы углерода, азота («элементарные ряды») и соединенных с аминокислотами. Он показал наличие в белковых молекулах таких связей, как —CO—NH— , и назвал их *биуретовыми*. На основании многочисленных исследований состава различных белков

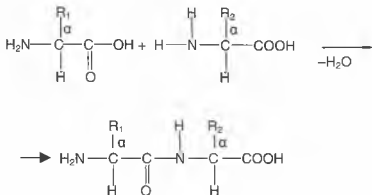
А.Я. Данилевский впервые в науке доказал полимерную природу белков.

Э. Фишер (немецкий химик-органик и биохимик) исследовал продукты кислотного и ферментативного гидролиза белков и установил, что белковые молекулы состоят из большого количества аминокислот. Э. Фишер синтезировал короткие белковые молекулы таким образом, что аминогруппа одной аминокислоты реагировала с карбоксильной группой другой аминокислоты. В результате таких реакций образовывалась пептидная связь. Он сравнивал синтезированные им вещества белковой природы (7-19 аминокислотных остатков) с продуктами неполного расщепления природных белков (пептидами). Сходство этих веществ доказывало, что и в природных белках аминокислоты соединены друг с другом пептидными связями.

В 50-х годах XX века Ф. Сэнгер показал, что белковая цепь имеет уникальную последовательность звеньев – *аминокислотных остатков* («остаток» – это то, что осталось от свободной аминокислоты после ее взаимодействия с другими аминокислотами в белковой цепи) [2].

Многочисленные исследования различных белков (вирусных частиц, бактериальных клеток, животных и растительных организмов) показали, что чаще всего в их составе обнаруживается 20 стандартных или основных аминокислот. Для таких аминокислот существует генетический код в виде *триплетов* (трех последовательно расположенных нуклеотидов в молекуле ДНК). В составе некоторых белков (антибиотиков, токсинов) присутствуют и другие аминокислоты, которые возникают из стандартных аминокислот в результате ферментативных модификаций белков уже после завершения их биосинтеза. Такие аминокислоты, как цистин, гидроксипролин, гидроксизин и некоторые другие, являются неcodируемыми. Кроме того, в составе природных белков обнаруживаются только α -аминокислоты и, как правило, в *L*-конфигурации.

Аминокислоты соединены друг с другом в цепь посредством прочной ковалентной пептидной (амидной) связи. Формирование такой связи осуществляется за счет COOH -группы одной аминокислоты и —NH_2 -группы другой аминокислоты. При этом выделяется молекула воды (реакция конденсации):



Цепочка аминокислотных остатков имеет химически регулярный осто́в («главную цепь»), от которой отходят различные боковые группы аминокислот – радикалы $\text{R}_1, \text{R}_2, \dots, \text{R}_n$.

Пептидная связь на 60% одинарная, а на 40% двойная, то есть является частично двойной, частично одинарной. Между этими структурами может осуществляться взаимный переход. Вращение вокруг двойной связи затруднено, и поэтому все атомы, составляющие пептидную группу, расположены в одной плоскости. В белковой молекуле вращения возможны вокруг других ковалентных одинарных связей ($\text{C}^\alpha-\text{C}$ и $\text{N}-\text{C}^\alpha$), длины которых больше, чем длина пептидной связи.

В зависимости от того, сколько молекул аминокислот входит в состав веществ белковой природы, эти соединения можно разделить на: 1) олигопептиды (от 2 до 20 аминокислотных остатков: ди-, три-, тетрапептиды и т.д.); 2) полипептиды (от 21 до 50 аминокислотных остатков); 3) белки (более 50 аминокислотных остатков и с молекулярной массой свыше 6000 Да). Гормон инсулин – один из самых маленьких белков – содержит 51 аминокислотный остаток. Впрочем, такая классификация веществ пептидной природы весьма условна, но часто используется в научной литературе.

Число аминокислотных остатков в полипептидной молекуле, как уже было сказано ранее, кодируется определенным геном и может колебаться от нескольких десятков до сотен тысяч. Разнообразие белков определяется не только количеством аминокислотных остатков, но и их качественным составом и последовательностью. Откуда берется такое разнообразие белковых молекул? Это можно объяснить на конкретном примере. Так, из 20 различных аминокислот (каждая из которых встречается в белке только один раз) может быть

образовано астрономическое число полипептидов – $20!$ ($20! = 20 \cdot 19 \cdot 18 \cdot 17 \cdot \dots \cdot 1 \approx 2 \cdot 10^{18}$). Но это очень короткие пептиды с молекулярной массой около 2 600 Да. Если попробовать синтезировать белковые молекулы с молекулярной массой около 34 000 Да из 12 различных аминокислот, встречающихся в этих молекулах в эквимольных соотношениях, то количество подобных полипептидов будет равно примерно 10^{100} . Число белков, построенных из 20 разных аминокислот, представленных в равных количествах, будет таково, что их масса превысила бы массу Земли. Но в живой природе встречается лишь небольшая доля возможных изомеров белковых молекул.

В функционирующих белках цепи свернуты строго определенным образом. Для характеристики пространственного строения белковых молекул применяют такие основные понятия, как *первичная, вторичная, третичная и четвертичная структуры*.

1.3.2. Первичная структура

Первичная структура белковой молекулы создается в процессе матричного биохимического синтеза в соответствии с информацией, кодируемой геном, и, следовательно, представляет собой порядок чередования определенного количества аминокислотных остатков в полипептидной цепи. Каждая белковая молекула начинается со свободной аминогруппы (N-конец), а заканчивается свободной карбоксильной группой (С-конец). Такая последовательность совпадает с направлением синтеза полипептидной цепи на рибосоме.

Любому полипептиду можно дать название в соответствии с названиями аминокислотных остатков, составляющих эту цепь, начиная с ее N-конца. В названии всех аминокислотных остатков окончания изменяются на «ил», а название последней аминокислоты остается без изменения (например, L-валил-L-треонил-L-пролин). Можно использовать сокращенное (трехбуквенное) название аминокислотных остатков при описании полной аминокислотной последовательности белка (например, Вал-Тре-Про). Очень часто для удобства пользуются тривиальными названиями белков (например, казеин, амилаза, лизоцим и пр.).

Основная химическая ковалентная связь, фиксирующая последовательность аминокислот в белковой цепи, – это *пептидная*. Очень важную роль в структуре белка играет как жесткость, так и плоская форма всей пептидной группировки. Поэтому конформационная подвижность пептидной связи (C–N) ограничена. Другие одинарные связи ($C^{\alpha} - C$ и $N - C^{\alpha}$) подвижны, и вокруг них возможно вращение. Уг-

лы вращения одинарных связей называются *торсионными* и имеют следующие обозначения: φ ($N-C^\alpha$) и ψ ($C-C^\alpha$) (рис. 1.2).

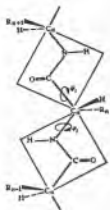


Рис. 1.2. Торсионные углы у α -углеродного атома в пептидной цепи

Длина химической связи близка к вандерваальсову радиусу атомов, то есть составляет 1-2 Å (1Å для связи C—H, N—H, O—H; около 1,3Å — для C=O, C—O, C—N и C=C; 1,5Å — для C—C; около 1,8Å — для S—S).

Наиболее характерные величины валентных углов составляют около 120° и около 109° . В белках обнаруживается большое число комбинаций торсионных углов. Тепловые комбинации торсионных связей и углов, а также вращения вокруг валентных связей вносят определенный вклад в гибкость белковой цепи.

Поскольку отталкивание массивных C^α -атомов в полипептидной цепи делает *цис*-конформацию энергетически невыгодной, то все пептидные группы в белках находятся в *транс*-конформации:



транс-конформация



цис-конформация

Поскольку первичная структура белков определяет все их последующие уровни организации и, следовательно, функции, то установ-

ление аминокислотной последовательности в белках имеет огромное значение.

К настоящему времени установлена аминокислотная последовательность более чем 2500 белков (ферментов, гормонов, гемоглобинов и др.).

В 1953 году Ф. Сэнгеру присудили Нобелевскую премию за расшифровку аминокислотной последовательности инсулина. Кстати, такая работа была проведена впервые. Чем выше молекулярная масса белка, тем сложнее изучить его аминокислотный состав и последовательность аминокислот в белковой молекуле. Одним из наиболее крупных белков, чья первичная структура установлена в 1971 г. Ю.А. Овчинниковым и А.Е. Браунштейном, был фермент аспартатаминотрансфераза (молекулярная масса этого димерного белка равна 93 000, каждая из цепей которого содержит 412 аминокислотных остатков).

Расшифровка аминокислотной последовательности различных белков свидетельствует о том, что большинство из них содержат все 20 стандартных аминокислот, но преобладающим является содержание глицина, аланина, аспарагиновой и глутаминовой кислот, а минимальным – содержание триптофана, гистидина, метионина и аргинина.

Исследования первичной структуры глобулярных белков показали, что хотя в них и отсутствуют какие-либо общие закономерности чередования аминокислот, но даже у очень различных по биологической активности белков (например, фермента рибонуклеазы и гормона инсулина) имеются одинаковые небольшие участки молекул. Так, эти молекулы схожи тремя одинаковыми трипептидами, одним тетрапептидом и пятью аналогичными трипептидами, отличающимися только одной близкой по строению аминокислотой (вместо аланина – валин и вместо аспарагиновой кислоты – глутаминовая).

Поскольку для различных организмов порой свойственны одинаковые биологические функции (перенос ионов через мембраны, регуляция концентрации глюкозы в крови, окислительное фосфорилирование и др.), то можно предположить, что и белки, выполняющие эти функции, должны иметь сходное строение. Действительно, исследования аминокислотной последовательности белков, выполняющих одну и ту же функцию в организмах различных видов, показали, что такие белки сходны по строению. Сходные (или одинаковые) по строению и выполняемым функциям белки разных видов организмов называются *гомологичными*.

Аминокислоты гомологичных белков, не подвергшиеся заменам, называются *стабильными*, а претерпевшие замену – *вариабельными*. Так, например, сравнение аминокислотной последовательности молекул инсулина различных животных показало, что в А-цепи обнаруживаются вариабельные аминокислоты в положениях 4, 8, 9, 10, 13, 14, 15 и 18 [3].

На основании изучения первичной структуры белков можно установить филогенетические взаимоотношения как между видами, так и между другими таксономическими группами живых организмов. Однако и внутри одного вида можно выявить полиморфизм аминокислотной последовательности в аналогичных белках. Этот факт может свидетельствовать о постоянно происходящей генотипической изменчивости, причиной которой являются не только мутации, но и кроссинговер.

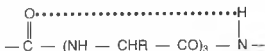
1.3.3. Вторичная структура

Пространственная организация белков (особенно глобулярных водорастворимых) очень сложна и разнообразна. Но даже в таких белках можно обнаружить набор «стандартных» структур – регулярные вторичные структуры.

Вторичной структурой белка называется регулярная, периодическая, упорядоченная конформация (пространственная форма) главной цепи, но без учета типа и конформации разнообразных боковых групп.

Регулярные вторичные структуры белков представлены в основном *α-спиралью* и *β-структурой (складчатый слой)*. Кроме упорядоченных, регулярных структур, в полипептидных цепях есть еще и *нерегулярные, бесструктурные области* (не образующие длинных периодических систем). Это так называемые *β-изгибы*. В изгибы обычно входит примерно половина аминокислотных остатков, не попавших в регулярные вторичные структуры [2].

Регулярная *α-спиральная структура* белка поддерживается водородными связями, располагающимися примерно параллельно оси спирали и образующимися за счет каждой карбонильной группы (C=O) и четвертой по ходу цепи NH-группы:



α -Спирали могут быть *правые* (приходят к нам, закручиваясь против часовой стрелки) и *левые* (приходят, вращаясь по часовой стрелке). Упорядоченный фрагмент α -спирали имеет ряд физических характеристик: число аминокислотных остатков на 1 виток спирали (3,6); число атомов в 1 витке, замыкаемом водородными связями (13); формула спирали $3,6_{-13}$ (индекс 13 обозначает минимальное число витков, на которых укладывается целое число аминокислотных остатков); диаметр спирали ($\approx 0,5$ нм); шаг спирали ($\approx 0,54$ нм).

Правая α -спираль более стабильна, и поэтому в природных белках обнаружены в основном только эти структуры. В правой α -спирали все атомы имеют оптимальную упаковку, то есть очень плотную, но без напряжения связей и атомов в молекуле. Боковые радикалы аминокислотных остатков в α -спирали обращены наружу и расположены по разные стороны от ее оси. В целом в белках таких спиралей много, а в фибриллярных – они достигают гигантской длины и включают сотни аминокислотных остатков. Однако есть спирали и без водородных связей, где плотная упаковка держится только на вандерваальсовых контактах. Это – *полипролиновая спираль*. При этом три цепи, каждая из которых скручена в растянутую левую спираль, перевиваясь, образуют правую суперспираль (плотно закручены друг вокруг друга). Такая полипролиновая спираль реализуется в коллагене.

Вытянутые, слегка скрученные цепи образуют *складчатую β -структуру*. Подобная структура может возникать в том случае, когда углы ϕ и ψ близки к -120° и $+135^\circ$. Поскольку β -структура – это хоть и очень вытянутая, но все же спираль, то она также имеет определенные физические характеристики: число аминокислотных остатков на виток (в плоском складчатом слое – 2, а в слегка скрученном – 2,3); проекция аминокислотного остатка на ось (0,33 нм); радиус «спирали» (0,1 нм) [3].

β -Структура бывает *параллельной* ($\beta\uparrow\uparrow$), *антипараллельной* ($\beta\downarrow\uparrow$) и *смешанной* (состоящей из $\beta\uparrow\uparrow$ и $\beta\downarrow\uparrow$). β -Структура стянута водородными связями и существует в виде более или менее крупных листов. Поскольку поверхность β -структуры рифленая, ее еще называют *складчатой β -структурой*.

Если антипараллельность цепей обеспечивает наиболее благоприятные условия для возникновения H-связей между ними, то в случае параллельного расположения цепей такие связи менее прочны. Боковые радикалы аминокислот в β -складчатых слоях ориенти-

рованы поочередно то по одну, то по другую сторону плоскости слоев. Такие белки, как фиброин шелка и кератин волос, образованы группой близко расположенных полипептидных цепей в молекуле белка.

В некоторых белках регулярные α -спиральные и β -структурные участки чередуются с бесструктурными областями.

1.3.4. Сверхвторичная структура и домены

По мнению ряда авторов [2, 3], в составе живых организмов существуют белки так называемого «смешанного типа», состоящие из α -спиралей и β -листов. Конформации таких ансамблей вторичной структуры называют *сверхвторичной структурой белковой молекулы*. Для них характерна слоистая структура, и энергетически они более предпочтительны по сравнению с обычной вторичной структурой белков.

В составе крупных глобулярных белков можно выделить области (участки), обособленные структурно и функционально. Такие субобласти, называемые *доменами*, как правило, соединяются друг с другом короткими пептидными (шарнирными) участками, не имеющими регулярной упорядоченной структуры.

Структурный домен в среднем состоит из 100-150 аминокислотных остатков и имеет диаметр около 2,5 нм. Несколько структурных доменов могут формировать функциональный домен. Например, димерный фермент глутатионредуктаза содержит структурные домены, выполняющие строго определенные функции в реакциях, катализируемых этим ферментом. В составе другого фермента – глицеральдегидфосфатдегидрогеназы – имеются два домена: НАД⁺-связывающий и каталитический. Эти домены формируют активный центр, который располагается в углублении между доменами.

Все многообразие белковых молекул, для которых характерна сверхвторичная доменная структура, можно разделить на несколько типов:

- 1) в α/β -доменах α -спирали параллельны друг другу, β -структура тоже параллельная, но α -спирали антипараллельны β -участкам, а чередование α - и β -участков в молекуле белка имеет вид $-\alpha-\beta-\alpha-\beta-$. Встречаются как плоские типы строения таких белков (укладка по Россманунну), так и цилиндрические (β -цилиндр лежит внутри цилиндра, сложенного из α -спиралей).

Примерами белков с α/β -доменами служат триозофосфатизомераза, малатдегидрогеназа, гексокиназа, субтилизин и др.;

- 2) $\alpha+\beta$ -доменные белки в своей основе имеют антипараллельную β -структуру. Среди таких белков встречаются молекулы ($\alpha\beta$ -складки), напоминающие α/β белки тем, что в них слой α -спиралей лежит на β -листе и, кроме того, α - и β -участки чередуются и в цепи, и в пространстве. Другие белки (собственно $\alpha+\beta$ белки) не имеют чередующихся участков, и в таких молекулах α -участки отделены от β -участков и расположены в цепи нерегулярно (блоками). Примерами $\alpha+\beta$ белков являются папаин, термолизин, инсулин, лизоцим и др.;
- 3) α -белки, в строении которых преобладают α -спирали (пучок спиралей) – миоглобин, гемоглобин и др.;
- 4) β -белки построены преимущественно из антипараллельных β -слоев (β -листов) – химотрипсин, рубредоксин, конканавалин-А и др.;
- 5) белки, содержащие домены без выраженной упорядоченной структуры.

Следует отметить, что очень похожие архитектуры часто встречаются в белках, совсем не сходных функционально или филогенетически.

1.3.5. Третичная структура

Дальнейшая, более сложная конформационная (пространственная) укладка вторичных и сверхвторичных структур одной полипептидной цепи в компактную структуру глобулярного белка называется *третичной структурой*. Впрочем, не всегда белки третичной структуры имеют форму шара – иногда они эллипсоидные, иногда нитевидные.

Третичная структура глобулярных белков характеризуется плотной упаковкой полипептидной цепи (в виде клубкообразной, напоминающей шар молекулы). Степень асимметрии (отношение длинной оси молекулы к короткой) таких белков равна 3-5. Если степень асимметрии находится в пределах 80, белки можно отнести к эллипсоидным. Такие белки, как фиброин шелка, кератин волос, копыт, ногтей, коллаген, имеют степень асимметрии свыше 80 и относятся к фибриллярным (нитевидным) белкам.

Образование и поддержание столь сложно организованных в пространстве молекул белков возможно благодаря наличию разнообразных по химической природе и прочности связей. Прежде всего,

это пептидная и водородная связи (характерные для вторичной и сверхвторичной структур), в образовании которых принимают участие только пептидные группы белков. Определенный вклад вносят связи, возникающие на основе химической природы радикалов: ионные (или солевые), гидрофобные взаимодействия, а также прочные ковалентные S—S-связи (возникающие между двумя остатками цистеина с образованием цистина). Считается, что главную роль в поддержании третичной структуры белковой молекулы играют гидрофобные взаимодействия. Они определяют локализацию гидрофобных цепей (радикалов) аминокислотных остатков в центральной части молекулы белка, уменьшая, таким образом, площадь их контакта с водой и увеличивая вандерваальсово взаимодействие [4] (рис 1.3).

Ионные (солевые, ион-ионные) связи возникают между противоположно заряженными радикалами аминокислотных остатков в молекуле белка. Положительный заряд обуславливают такие аминокислоты, как аргинин, лизин и гистидин, а отрицательный заряд – глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Заряженные группы на поверхности белковой молекулы, как правило, сольватированы и окружены противоионами. Это увеличивает растворимость белков в водных растворах. Внутри глобулярного белка заряженные группы формируют солевые мостики.

Водородные связи возникают между группами, не участвующими в образовании пептидной связи (например, между остатками тирозина и глутаминовой кислоты).

В водной среде гидрофобные боковые радикалы аминокислотных остатков за счет *гидрофобных взаимодействий* образуют компактно упакованные области, стабилизирующие третичную структуру белка. На поверхности такого белка также могут находиться неполярные радикалы, которые в результате пространственной организации образуют *гидрофобные кластеры*. В формировании гидрофобных взаимодействий принимают участие такие аминокислоты, как аланин, валин, лейцин, изолейцин и метионин [5].

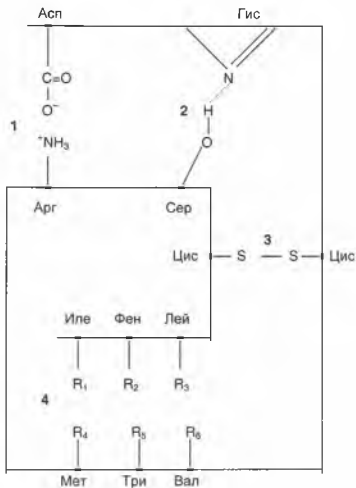
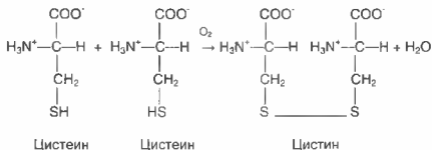


Рис. 1.3. Связи, стабилизирующие третичную структуру белковой молекулы:
 1 – электростатическое притяжение; 2 – водородная связь; 3 – поперечная ковалентная связь в остатке цистина (S—S-связь или дисульфидный мостик); 4 – гидрофобные R-группы аминокислот внутри молекулы, защищенные от контакта с водой

Хотя третичная структура белков своим существованием в основном обязана слабым взаимодействиям (ионным, водородным, гидрофобным), которых достаточно для защиты белков от повреждающих воздействий внутри клетки, однако, внеклеточным белкам (инсулину крови, пищеварительным ферментам) необходима дополнительная степень защиты от более жесткого внеклеточного окружения. Это возможно благодаря попарному связыванию пространственно сближенных (но не соседних) радикалов цистеина с образованием *ковалентной дисульфидной связи (S—S-мостиков)*:



Окисление сульфгидрильных (тиольных) групп в присутствии O_2 или некоторых других реагентов приводит не только к стабилизации конформации белковой молекулы, но и определяет характер свертывания полипептидной цепи.

Все многообразие возникающих связей и взаимодействий в белках третичной структуры приводит в итоге к формированию единственно правильной нативной конформации полипептидной цепи. Только после этого белок способен проявить свою *специфическую функциональную активность*. Такие биологически активные глобулярные белки, как ферменты, гормоны, рецепторы, антитела и др., выполняют присущие им функции только после завершения их «созревания», что во многом определяется формированием нативной пространственной структуры.

Перечисленные выше глобулярные белки способны изменять свою конформацию в процессе выполнения ими определенных функций. Однако существует группа белков, которые отличаются нерастворимостью в воде, высокой механической прочностью, эластичностью и упругостью. Как правило, в состав таких белков входит значительное количество неполярных аминокислот, формирующих различные структуры (α -спирали; β -складчатые слои; молекулы, скру-

ченные в особый вид спирали). Именно фибриллярные белки выполняют в основном структурно-механические функции.

Так, основу волоса (длинного, нерастворимого, достаточно прочного волокна) составляет α -кератин. Лишенные эластичности, необыкновенно прочные сухожилия, связывающие мышцы с костями, построены из коллагена (структурной единицей коллагена является тропоколлаген, для которого характерно высокое содержание глицина – примерно 30%, пролина \approx 21% и аланина \approx 11%). Совсем иные свойства (прочность, эластичность, упругость) характерны для кожи, стенок артерий или легочных альвеол, и определяются они другим фибриллярным белком – эластином. Уникальные свойства, присущие перечисленным выше белкам, придают им не столько слабые внутри- и межмолекулярные взаимодействия, сколько ковалентные непептидные дисульфидные связи. Фиброин шелка имеет сходную с β -кератином пространственную структуру и содержит много глицина, серина и аланина. Белок резилин, обнаруженный в наружном скелете насекомых, богат глицином и аланином, не содержит гидроксипролина, чем напоминает фиброин шелка. В состав первичной клеточной стенки высших растений входит фибриллярный белок экстенсин (содержит до 33% гидроксипролина). Очень редкие производные аминокислот (бромтирозин и иодтирозин) встречаются в фибриллярных белках, формирующих опорные структуры кораллов, губок и медуз.

Пространственную структуру белков изучать достаточно сложно, так как не все полипептидные молекулы можно выделить, очистить и подвергнуть физико-химическому анализу. Водорастворимые белки, полученные в виде кристаллов, можно исследовать с помощью рентгеноструктурного анализа. Этот метод позволяет установить распределение электронной плотности в кристалле и тем самым – пространственное строение молекул, определить расположение полипептидной цепи в пространстве, обнаружить участки регулярной структуры, изгибы цепи, выявить расположение аминокислотных остатков, места присоединения небелковых частей (кофакторов, простетических групп и т.п.). Оптические методы (дисперсия оптического вращения, круговой дихроизм, инфракрасная спектроскопия) позволяют получить информацию о типе и доле упорядоченных структур в полипептидной цепи, а также о возникших конформационных изменениях белков [6].

1.3.6. Четвертичная структура

Третичной структурой завершается описание строения отдельной молекулы белка. Однако в природе достаточно много белков, образованных несколькими полипептидными молекулами (*протомерами* или *субъединицами*), соединенными нековалентными связями. Такие комплексы называют *олигомерными*, *мультимерными* или *субъединичными белками*. Пространственная укладка субъединиц в функционально активный макромолекулярный белковый комплекс называется *четвертичной структурой белка*. Обычно белки четвертичной структуры имеют молекулярную массу более 50 000-100 000 Да.

Количество субъединиц в олигомерных белках колеблется от 2 до 12, но чаще всего – 2 и 4. Жгутики бактерий, капсиды вирусов представлены объединением нескольких сотен субъединиц. Иногда белки построены из одинаковых типов протомеров, а иногда – из разных. Например, тетрамер гемоглобина образован двумя похожими, но неидентичными субъединицами α и β ($\alpha_2\beta_2$).

Субъединицы соединяются в олигомерный белок с помощью ионных и водородных связей, гидрофобных взаимодействий, а также благодаря *комплементарности* поверхностей протомеров.

Многочисленные внутриклеточные белки являются олигомерными, а большинство внеклеточных – мономерными с большей или меньшей молекулярной массой. Поскольку четвертичная структура весьма чувствительна к изменениям внешних условий, ей отводится определенная роль в регуляции биологической активности белков. Даже незначительные изменения в пространственной структуре олигомерного белка (нарушение нативного взаиморасположения субъединиц) приводит к изменению биологической активности этого белка.

Это явление лежит в основе многих *механизмов регуляции метаболизма* не только в клетке, но и в целостном организме, поскольку многие ферменты и другие биологически активные белки имеют четвертичную структуру.

1.4. Простые и сложные белки

Все многообразие белков можно разделить на две большие группы: 1) *простые* (состоят только из аминокислот); 2) *сложные* (при гидролизе помимо аминокислот дают и другие химические компоненты, которые называются *простетическими группами*). Каждая из этих групп, в свою очередь, подразделяется на подгруппы.

Простые белки подразделяют в соответствии с их растворимостью в различных веществах. Сложные белки классифицируют в зависимости от химической природы их простетических групп.

1.4.1. Простые белки (протеины)

Кислотный или щелочной гидролиз простых белков приводит к их расщеплению только на аминокислоты. Такие белки называются *простыми (неконъюгированными) белками* или *протеинами*. Для каждого индивидуального простого белка характерны определенное соотношение разных аминокислот и, как следствие, различные физико-химические свойства (например, растворимость в полярных и неполярных растворителях и пр.).

В целом все многообразие существующих в природе протеинов можно разделить на следующие группы: альбумины, глобулины, проламины, глютелины, гистоны, протамины и протеиноиды.

Альбумины хорошо растворяются в воде и осаждаются насыщенным раствором сульфата аммония. *Альбумины* составляют 50% всех белков плазмы крови человека. Такое же количество альбуминов находится и в белке яиц. Из молока выделен лактальбумин. В растениях также много специфических типов альбуминов.

Глобулины нерастворимы в воде, но хорошо растворимы в слабых растворах нейтральных солей. 50%-ный раствор сульфата аммония используют для высаливания глобулинов. *Основу белков семян многих растений* (особенно бобовых и масличных) составляют глобулины (легумин – из семян гороха, фазеолин – из семян фасоли, эдестин – из семян конопли).

Проламины хорошо растворяются в 60-80%-ном этаноле. В составе этих белков обнаруживается большое количество пролина и глутаминовой кислоты, но очень мало лизина, аргинина и глицина. *Проламины* представляют собой комплексы белков и находятся только в семенах злаковых культур. Например, белок глиадин – в семенах пшеницы и ржи, гордеин – в семенах ячменя, зеин – в семенах кукурузы. *Проламины* выполняют в основном запасную функцию.

Глютелины хорошо растворимы в 0,2-2%-ных растворах гидроксида натрия. *Глютелины* содержатся не только в семенах различных видов растений, но и в их зеленых частях (листьях, стеблях). Глютелины, выделенные из семян пшеницы, получили название глютелины, а из семян риса – оризеины. Технологические качества муки (и теста) определяются клейковиной (комплексом глиадина и глютелина семян пшеницы).

Гистоновые белки растворимы в слабых кислотах (0,2 н HCl) и осаждаются спиртом или аммиаком. Доля основных аминокислот в гистонах составляет 20-30%. Эти белки обнаруживаются преимущественно в ядрах всех видов эукариотических клеток и принимают участие в формировании нуклеосомной структуры хроматина. В эволюционном плане гистоновые белки (особенно гистон H4) являются весьма консервативными.

Протамины растворяются в слабых кислотах и осаждаются кипячением. Это сильно основные белки (содержание щелочных аминокислот составляет около 80%) с молекулярной массой меньше 12 000 Да. Протамины содержатся в половых клетках животных и составляют основную массу белков хроматина этих клеток. Необходимым условием сохранения наследственных свойств организма является биохимическая инертность ДНК, которую обеспечивают протамины, вытесняющие гистоны из нуклеопротеинов и образующие прочный комплекс с ДНК. В результате этого взаимодействия наследственные свойства организма оказываются защищенными от неблагоприятных воздействий. Протаминов много в сперме рыб (например, сальмин выделен из лососевых рыб, а клупеин – из сельди). В спорах плауна также обнаружены протамины.

Протеиноиды – это трудно растворимые белки (например, фиброин шелка; кератины волос, копыт, перьев; коллагены соединительной ткани; спонгин из морских губок), для которых характерна высокая концентрация серосодержащих аминокислот.

К простым белкам относятся такие ферменты, как рибонуклеаза и химотрипсин, поскольку они состоят из одних только аминокислот и никаких других химических групп не содержат.

1.4.2. Сложные белки (протеиды)

Белки, которые при гидролизе помимо аминокислот дают и другие химические компоненты (органические или неорганические группировки), называются *сложными (конъюгированными) белками, или протеидами*. Неаминокислотная часть сложных белков обычно называется *простетической группой* и играет важную роль при выполнении белком его биологической функции. Сложные белки классифицируют в зависимости от химической природы их простетических групп: липопротеиды, гликопротеиды, фосфопротеиды, хромопротеиды, металлопротеиды и др. [7].

Липопротеидами называются сложные белки, простетической группой которых являются липиды, соединенные с белковой частью

молекулы в основном с помощью гидрофобных, ионных и водородных связей. Если липидный компонент преобладает над белковым, то такие комплексы называются *протолипидами* (обнаруживаются в больших количествах в миелиновой оболочке нервных клеток, в синаптических мембранах и внутренней мембране митохондрий). Липидная часть липопротеидов может быть представлена и полярными липидами, и нейтральными липидами, и холестерином (или его эфирами). Такие сложные белки встречаются в живой природе повсеместно (например, в составе мембран, в составе крови – β_1 -липопротеид, в белом веществе мозга – инозитолдифосфатсодержащий липопротеид, в сером веществе мозга – сфинголипиды).

Гликопротеидами называются сложные белки, в состав которых входят сахара. Углеводная простетическая группа (линейная или разветвленная), как правило, присоединяется ковалентно к аспарагину, серину или треонину. Анализ качественного состава углеводной части гликопротеидов показал преимущественное содержание таких моносахаридов, как D-галактоза, D-манноза, D-глюкоза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, L-фукоза, L-рамноза, D-ксилоза, L-арабиноза, нейраминовая кислота (чаще встречается в виде сиаловых кислот). Если углеводные группировки сложных белков содержат 15-20 моносахаридных компонентов, не формирующих повторяющихся олигосахаридных участков, то такие белки называются *истинными гликопротеидами*. Если же углеводная часть белков содержит повторяющиеся ди- или олигосахаридные фрагменты, то такие белки называются *протеогликанами*. Количество углеводных цепей в гликопротеидах колеблется в достаточно широких пределах. Например, в молекуле трансферрина насчитывается до 4 цепочек углеводов, а в молекулах муцинов слюны – 300-800. Если говорить о доли углеводного компонента в гликопротеидах, то можно привести следующие примеры: в овальбумине на долю сахара приходится 1-3%, а в белках крови, определяющих ее принадлежность к той или иной группе, – 80-90%.

Молекулярная масса гликопротеидов достаточно велика. Особенно это свойство характерно для протеогликанов, масса которых может достигать нескольких миллионов. Растворы таких сложных белков обладают значительной вязкостью. Протеогликаны, называемые *гликозамингликанами*, содержат такие полисахаридные простетические группы, как гепарин, гепаринсульфат, кератинсульфат, хондроитинсульфат, гиалуоновую кислоту. Поскольку гликозамингликаны содержат карбоксильные группы уроновых кислот и сульфатные

группы аминоксахаридов, для них характерны полианионные свойства.

Гликопротеиды встречаются в природе повсеместно и выполняют различные функции: каталитическую, структурно-механическую, рецепторную, избирательного взаимодействия клеток, транспортную, свертываемости крови и противосвертываемости, защитную и др.

Фосфопротеидами называются сложные белки, простетической группой которых, как правило, является ортофосфорная кислота. Фосфатные группы соединяются с цепочкой белка обычно через серин и треонин с помощью сложноэфирной связи. Такие белки, как казеин молока (его можно отнести к фосфогликопротеинам, так как он содержит еще и углеводный компонент), вителлин и фосвитин яичного желтка, ихтулин икры рыб, являются типичными примерами фосфопротеидов. Доля фосфора в этих белках составляет от 1 до 10%.

Хромопротеидами называются сложные белки, в состав которых входят различные по химической природе простетические группы, определяющие окраску белков. Можно выделить такие хорошо известные группы хромопротеидов, как флавопротеиды (в их состав входят флавиновые нуклеотиды – флавинадениндинуклеотид или флавинаденинмононуклеотид) и гемопротеиды (в качестве простетической группы выступает гем – комплекс железа с протопорфирином). Типичным примером флавопротеидов является сукцинатдегидрогеназа, а гемопротеидов – гемоглобин.

К хромопротеидам относятся такие окислительно-восстановительные ферменты, как каталаза и пероксидаза, а также цитохромы (белки-переносчики электронов), простетической группой которых является порфириновое кольцо.

Металлопротеидами называются сложные белки, простетической группой которых являются ионы металлов (Fe, Cu, Zn, Mo, Mn, Se, Ni, Ca и др.). Например, железосодержащими белками являются ферритин и трансферрин (белки крови); медьсодержащими – цитохромоксидаза, церулоплазмин (белок крови), пластоцианин (переносчик электронов); цинксодержащим – алкогольдегидрогеназа; никельсодержащим – никелеплазмин (макроглобулин сыворотки крови).

1.5. Функции белков

Кроме перечисленных ранее классификаций белков (по пространственной конформации, по форме, по составу), можно выделить еще

одну – в соответствии с их биологическими функциями. По этому признаку все белки можно разделить на несколько групп:

1. Белки, выполняющие *каталитическую* функцию (ферменты), являющиеся одной из самых высокоспециализированных и многообразных групп белков. Более 95% химических реакций, протекающих в различных клетках, катализируются ферментами. Ферменты присутствуют во всех компартментах клетки и вне ее. Некоторые из ферментов присутствуют в большинстве видов организмов, а некоторые – являются уникальными и характерными только для одного какого-то вида. К настоящему времени открыто около 3000 различных ферментов (амилаза, каталаза, рибонуклеаза, трипсин и др.).

2. К белкам, выполняющим *регуляторную* функцию, относятся те из них, которые участвуют в системе регуляции клеточной или физиологической активности. Например, многие гормоны (инсулин, соматотропин, кортикотропин, паратиреоидный и др.); белки-репрессоры (регулирующие биосинтез ферментов в бактериальных клетках); рилизинг-факторы (либерины и статины) и пр.

3. *Защитную* функцию выполняют белки, предохраняющие организм от повреждений или защищающие его от вторжения других организмов. К числу таких белков можно отнести, например, антитела (иммуноглобулины) и систему комплемента (важнейшие факторы иммунитета, способные распознавать проникшие в организм бактерии, вирусы или чужеродные белки других видов, а затем нейтрализовать их или связываться с ними); фибриноген и тромбин (белки, участвующие в процессе свертывания крови, защищающем организм от ее чрезмерной потери); яды пчел, змей, пауков, скорпионов, грибов, бактериальные токсины, токсичный белок растений (рицин) – защищают организмы в процессе их борьбы за существование; слизистые белки (муцины) образуют защитный слой пищевода и желудка; коллаген и кератин предохраняют тело животного от экзогенных воздействий.

4. *Транспортная* функция присуща не только белкам биомембран (белки-переносчики ионов, глюкозы, аминокислот и т.д.), но и белкам крови (белки плазмы крови осуществляют связывание и перенос специфических молекул и ионов из одного органа в другой; гемоглобин, содержащийся в эритроцитах, связывает кислород при прохождении крови через легкие и доставляет его к периферическим тканям).

5. *Рецепторная* функция характерна в основном для таких белков, как гликопротеины и лектины. Благодаря этой важнейшей функции осуществляется процесс гормональной регуляции клеточного

метаболизма со стороны организма, возможны явления фоторецепции и взаимного распознавания клеток друг другом, а также происходит получение информации от других клеток, тканей, органов или даже других организмов (например, реакция организмов на действие аттрактантов и репеллентов).

6. *Структурная, опорная, механическая* функции характерны не только для отдельных клеток, но и для сложного многоклеточного организма. Так, сложную жидкостно-мозаичную структуру мембран формируют интегральные белки в комплексе с липидами. Форму и объем клетки поддерживает такая внутриклеточная организация белков, как цитоскелет; коллаген – это главный прочный компонент хрящей и сухожилий; эластин – структурный белок связок; волосы, чешуя, перья, панцирь черепах состоят почти исключительно из прочного нерастворимого белка кератина; главный компонент паутины и шелковых нитей – фиброин – тоже белок.

7. Некоторые клетки способны изменять свою форму, передвигаться, сокращаться. Перечисленные функции характерны и для одноклеточных организмов (амеб, инфузорий, жгутиковых бактерий), и для многоклеточных организмов (животных – мышечное сокращение, насекомых – работа крыльев). Такие белки, как миозин, актин, тубулин, а также некоторые другие белки, являясь важными элементами ресничек, жгутиков, немышечных клеток, сократительной системы скелетных мышц, выполняют *двигательную* и *сократительную* функции.

8. *Запасающая и пищевая* функции характерны для другой группы белков. В процессе прорастания семян используются запасные белки. Железо запасается в виде белка ферритина. К пищевым белкам относятся яичный альбумин (основной компонент яичного белка) и казеин (главный белок молока).

В природе имеется много других белков, функции которых уникальны и необычны. Например, белок *монеллин* имеет очень сладкий вкус. *Белки со свойствами антифриза*, содержащиеся в плазме крови арктических рыб, предохраняют их кровь от замерзания. *Резилин* – белок, составляющий основу "шарнира" в местах прикрепления крыльев у некоторых насекомых [2].

1.6. Свойства белков

1.6.1. Денатурация белков

Естественное состояние белков в живой клетке называется нативным. Изменение (нарушение) нативной структуры белков под действием различных факторов называется денатурацией. При этом разрываются такие связи, как водородные, ионные, гидрофобные, дисульфидные, но пептидные связи остаются без изменений. Таким образом, денатурация приводит к нарушению четвертичной, третичной и вторичной структур, и, как следствие, белок при этом утрачивает характерную для него биологическую активность.

Процесс денатурации может быть вызван как физическими, так и химическими факторами.

Характер и механизм воздействия химических факторов (денатурантов) определяется их строением. Так, амидные группы мочевины и формамида нарушают водородные и гидрофобные взаимодействия; органические растворители (этиленгликоль, спирт, ацетон и др.), а также неполярные алифатические и ароматические углеводороды нарушают внутримолекулярные гидрофобные взаимодействия; катионы тяжелых металлов (Pb^{2+} , Cd^{2+} и др.) нарушают систему ионных и водородных связей; таннин приводит к блокированию полярных группировок. Существенные изменения pH также приводят к денатурации белков, так как при этом все соответствующие диссоциирующие группы белка имеют одноименный заряд. Одноименные заряды, как известно, отталкиваются, что приводит к разрыву слабых связей и денатурации белка.

К наиболее известным факторам физической природы относятся температура, высокое давление, ультрафиолетовый свет, ионизирующее излучение. Действие такого физического фактора, как температура, является наиболее общим и хорошо изученным. Повышение температуры приводит к увеличению скорости теплового движения полипептидной цепи и, как следствие, – к разрыву водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Большинство белков при тепловой денатурации агрегируют и выпадают в осадок. Обычно денатурация белков наблюдается *in vitro* при воздействии на них аномальной температуры (высокой или очень низкой). Если белок не очень велик и не подвергся сильной химической модификации после сворачивания *in vivo*, то разрушенная температурой архитектура

белка спонтанно восстанавливается при оптимизации (нормализации) условий среды.

Изменение нативной конформации белковой молекулы, а затем ее повторная самоорганизация (*ренатурация*) происходят и в живой клетке, например, при переносе белков через мембраны.

1.6.2. Растворимость белков

Основу протоплазмы любой живой клетки составляет вода. Межклеточное пространство является гидрофильной средой. Поэтому очевидно, что большинство биомолекул, в том числе и значительная часть белков, хорошо растворимы в водных растворах. В водном окружении полярные радикалы аминокислотных остатков (аспарагиновой и глутаминовой кислот, лизина, аргинина, гистидина), расположенные на поверхности белковой молекулы, способны связываться с диполями воды, то есть *гидратироваться*. Такие незаряженные полярные аминокислоты, как аспарагин, глутамин, серин и треонин, способны образовывать с водой водородные связи. Гидрофобные аминокислотные остатки белка (аланин, валин, метионин, фенилаланин и др.) в гидрофильной среде всегда формируют специфическую область внутри полипептидной молекулы.

Гидрофильные и гидрофобные радикалы аминокислотных остатков не только способствуют формированию нативной пространственной конформации данного белка, но и влияют на растворимость других веществ, проявляя свойство *эмульгаторов*. То есть белок, формирующий тонкую пленку на поверхности капелек жира, препятствует их слипанию. В таком эмульгированном состоянии находятся жиры в крови и лимфе человека. Казеин также выступает в роли эмульгатора жира в воде, и поэтому молоко называют эмульсией.

В присутствии небольших концентраций солей – Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 и др. – растворимость белков в воде увеличивается, так как при этом увеличивается степень диссоциации ионизированных групп белка и ослабляются межмолекулярные взаимодействия полипептидных молекул. Даже незначительные концентрации органических растворителей (ацетона, этанола) в белковом растворе приводят к уменьшению растворимости белков.

Растворенные белки проявляют такие свойства коллоидов, как рассеивание света, высокая вязкость, неспособность пройти через полупроницаемую мембрану и др. Проявляя коллоидные свойства, растворы белков могут терять свою текучесть, а также образовывать

гели, представляющие собой соединения молекул белков в виде сетки. Гели способны связывать большое количество воды, увеличивая при этом свой объем (набухать). Это явление лежит в основе способности соединительной ткани животных поглощать и запасать некоторое количество воды.

1.6.3. Осаждение белков

Осаждение (высаливание) белков применяют для выделения и очистки отдельного белка или пула сходных по свойствам белков. Как правило, для этих целей используют высокие концентрации нейтральных солей. Большие концентрации ионов в водном растворе приводят к оттягиванию на себя поляризованных молекул воды от заряженных групп белка. В результате этого белок частично теряет гидратную оболочку, препятствующую его осаждению из раствора. Наиболее эффективно процесс высаливания происходит в изoeлектрической точке (ИЭТ) белка, так как отсутствует электростатическое отталкивание между молекулами белков. Размерами, величиной заряда и способностью к гидратации определяется эффективность высаливающего действия ионов. В зависимости от перечисленных выше свойств все ионы можно представить в виде *лиотропных рядов (ряды Гофмейстера)*. В более щелочной среде по сравнению с ИЭТ белка такой ряд анионов будет выглядеть следующим образом: $\text{SO}_4^{2-} > \text{F}^- > [\text{цитрат}]^{4-} > [\text{тарترات}]^{2-} > [\text{ацетат}]^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{CNS}^-$, а для катионов – $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ [4].

Иногда для осаждения белков применяют высокие концентрации органических растворителей. Этот факт объясняется уменьшением диэлектрической постоянной среды и уменьшением степени гидратации белков, которые приводят к увеличению притяжения между противоположно заряженными группами в белковой молекуле и, как следствие, к агрегации белков и их осаждению.

1.6.4. Оптические свойства

Для количественного определения белков в растворе часто используют спектрофотометрический метод, основанный на способности белков поглощать ультрафиолетовый свет в диапазоне длин волн от 190 нм (обусловлено главным образом наличием пептидных связей) до 280 нм (определяется наличием в белках триптофана,

тирозина и фенилаланина). Условно считают, что 1 единица оптической плотности раствора при длине волны 280 нм соответствует концентрации, приблизительно равной 1 мг белка на 1 мл раствора при толщине кюветы 1 см. Этот метод позволяет говорить лишь о примерной концентрации белка в растворе, так как количество ароматических аминокислот в разных полипептидных молекулах различно.

При поглощении белком кванта света в ультрафиолетовой области наблюдается такое явление, как *флуоресценция* (способность молекулы белка испускать квант света при переходе из электронновозбужденного состояния в основное).

Хромопротеины (цитохромы, гемоглобин, флавопротеиды и др.) способны поглощать свет в видимом диапазоне длин волн (380-760 нм). Выбор соответствующей длины волны зависит от химической природы простетической группы хромопротеидов, определяющей цвет белка.

Все белки поглощают свет в инфракрасной (ИК) области спектра (760-10 000 нм). Выявить относительное содержание α -спиралей, β -структур и неструктурированных участков в белковой молекуле можно с помощью ИК-спектроскопии. С помощью поляризованного ИК-света определяют расположение водородных связей относительно цели белка.

Белки способны вращать проходящий через них плоскополяризованный свет и неодинаково поглощать левый и правый циркулярно поляризованный свет. Это свойство белков определяется наличием в их молекулах хиральных (асимметрических) атомов углерода и делает их оптически активными молекулами.

ГЛАВА ВТОРАЯ ФЕРМЕНТЫ

В клетках протекают тысячи метаболических реакций, идущих в соответствии с законами термодинамики. Любую химическую реакцию можно представить как процесс превращения одного вещества в другое (или другие):

$S \rightarrow P$, где S – первичный субстрат, P – конечный продукт.

Для того, чтобы молекула исходного вещества превратилась в конечный продукт, она должна перейти в возбужденное состояние, облегчающее переход ее в продукт. Переход молекул исходного вещества в возбужденное состояние обычно требует притока энергии извне. Суммарная реакция $S \rightarrow P$ должна сопровождаться уменьшением свободной энергии, иначе по законам термодинамики она произойти вообще не может. Однако в переходной стадии молекула субстрата может обладать большей свободной энергией (S^*), чем исходная. Положительное изменение свободной энергии при превращении $S \rightarrow S^*$ называют энергией активации для данной реакции (E_a).

Итак, чтобы реакция протекала, необходимо внести в систему энергию активации. В некатализируемых реакциях источником энергии активации служат столкновения между молекулами в ходе теплового движения, поэтому скорость реакции будет низка. Повышение скорости реакции происходит с увеличением температуры, так как возрастает число эффективных соударений молекул, превращающих S в S^* .

В биохимической системе температура не должна превышать уровень, вызывающий денатурацию белков, поэтому скорости протекания реакций без катализа ничтожно малы. Значительным шагом в развитии живых систем стал феномен возникновения ферментативного катализа. Ферменты способны к тысячекратному ускорению реакций, снижая энергию активации исходных субстратов.

2.1. Химическая природа ферментов

2.1.1. Структурно-функциональная организация молекулы фермента

По химической природе ферменты являются белками. Другими известными биологическими катализаторами служат молекулы РНК. Причем в процессе химической эволюции, вероятно, катализ с по-

мощью рибонуклеиновых кислот был первичен. Однако затем преимущество оказалось за белками. Причина выбора белков в качестве основных биокатализаторов заключается не только в их химическом составе, дающем огромное разнообразие сочетаний остатков α -аминокислот, но и в специфической структурной организации белковых молекул. Фолдинг (приобретение нативной структуры) белков – высококооперативный (взаимозависимый) процесс в сравнении с фолдингом РНК. В отличие от белков РНК обладает исключительно стабильной вторичной структурой при отсутствии третичной. Кроме того, боковые остатки азотистых оснований РНК направлены внутрь спирали, в то время как в белках боковые остатки аминокислот располагаются по периферии, что определяет возможность кооперативных гидрофобных взаимодействий и образования третичной структуры. Высокая кооперативность фолдинга и наличие слабых некомплементарных взаимодействий и определило выбор белков в качестве основных катализаторов биохимических процессов.

Большинство ферментативных белков имеет глобулярную структурную организацию. Примером фибриллярной структурной организации может служить миозин (мышечный сократительный белок), обладающий АТФ-азной активностью (способность расщеплять АТФ). Среди ферментативных белков чаще можно встретить α/β тип организации глобулы, при котором в центральной части молекулы находятся более рыхлые β -складчатые участки, а по периферии – α -спирализованные. Многие ферменты представляют собой олигомерные белки, состоящие из нескольких субъединиц или функциональных доменов. Глобулярные белки могут содержать несколько структурных доменов. Различные домены обычно выполняют неодинаковые функции. Домен одного и того же типа может входить в состав разных ферментов (например, НАД-связывающий домен дегидрогеназ). Олигомерные ферменты могут состоять из аналогичных (но не полностью идентичных) субъединиц, выполняющих сходные функции. В таком случае субъединицы называют *протомерами*. Они могут обладать ферментативной активностью менее выраженной, чем олигомер. Если же только один тип субъединиц олигомерного фермента участвует в катализе, а остальные выполняют некаталитические функции (например, регуляторные), то такой фермент называют *сложным*. Примером служат протеинкиназы, состоящие из двух каталитических и двух регуляторных субъединиц. Большинство известных олигомерных ферментов являются димерами или тетрамерами. Следующей по численности группой олигомеров следует назвать гексамеры. Как и некоторые димеры, гексамеры склонны к дальней-

шей ассоциации с образованием более крупных агрегатов. Встречаются также октамеры и реже тримеры и пентамеры. Можно обоснованно утверждать, что олигомеры с четным числом субъединиц распространены значительно шире, чем с нечетным [12]. На вопрос о значении четвертичной структурной организации в реализации каталитической функции ферментов не существует однозначного ответа, многое определяется природой самого фермента и реакции, которую он катализирует. В настоящее время общим принципом считается повышение устойчивости ферментов при образовании четвертичной структуры, а также важность данной структурной организации для регуляции активности ферментов.

Каталитическая активность ферментов обусловлена наличием активного центра, имеющего внутреннее расположение обычно в рыхло спирализованной части молекулы. Активный центр имеет реактивные в химическом отношении функциональные группы. Часть из них способна принимать протоны и получила название нуклеофильных функциональных групп. К нуклеофильным группам активных центров ферментов можно отнести амино- и иминогруппировки, гидроксильные и гуанидиновые группы. Другие способны преимущественно к присоединению электронов и называются электрофильными. Например, сульфгидрильные группы. Следует отметить, что нуклеофильность и электрофильность весьма зависят от реакции среды, поэтому одни и те же функциональные группы могут служить как нуклеофилами, так и электрофилами в зависимости от условий или степени восстановленности. Более поверхностно расположены группы захвата субстрата, обеспечивающие физическое и химическое соответствие молекулы субстрата активному центру фермента и обуславливающие такое свойство ферментов, как субстратная специфичность. В некоторых случаях специфичность по отношению к субстрату практически абсолютна, но это встречается редко. Чаще ферменты проявляют специфичность к определенному классу соединений или определенной химической связи, которую они превращают. После захвата субстрата химическое превращение осуществляется с помощью функциональных групп каталитической части активного центра. Кроме активного центра в молекулах фермента имеется регуляторный центр, к которому присоединяются модификаторы – вещества, модулирующие ферментативную активность. Многие ферменты в своем составе имеют небелковый фрагмент, принимающий участие в катализе – кофермент.

2.1.2. Коферменты

Коферменты – это небелковые компоненты ферментов, которые выступают в роли дополнительных реагентов или вторых субстратов. Коферменты можно разделить на три группы.

2.1.2.1. Соединения с высоким потенциалом переноса фосфатных групп

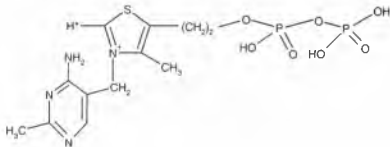
К таким коферментам относятся АТФ, ГТФ и другие нуклеозид-трифосфаты. Поскольку освобождение АТФ из комплекса с ферментом происходит только после его расщепления, АТФ чаще считают субстратом, а не коферментом.

2.1.2.2. Соединения, часто являющиеся производными витаминов

Находясь в активном центре фермента, данные коферменты взаимодействуют с субстратом и так изменяют его структуру, что его реакционная способность повышается. Если кофермент способен диссоциировать от белковой части фермента (*холофермент*), то он называется *кофактором*; если связь прочная, ковалентная и кофермент не диссоциирует – *простетической группой*.

Некоторые примеры таких коферментов и реакции, которые они катализируют:

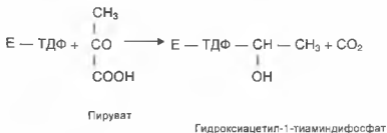
а). *Тиаминдифосфат (ТДФ)*



Водород, указанный звездочкой, легко диссоциирует в ходе катализа.

ТДФ участвует в реакциях α -конденсации и α -расщепления.

Наиболее изученным ферментом, катализирующим реакции с участием ТДФ, является пируватдегидрогеназа, осуществляющая окисление пирувата с одновременным декарбоксилированием:



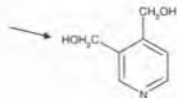
ТДФ является коферментом ферментов, играющих важную роль в системе транспорта натрия через мембрану нейронов, поэтому недостаточность тиамина (В₁) у человека приводит к развитию тяжелых параличей, так как нарушает проведение нервного импульса.

б). *Пиридоксальфосфат (ПФ)*

Необходим для многих ферментов, катализирующих реакции переаминирования и дезаминирования. Так как число таких реакций в клетках огромно, то и роль данного кофермента весьма значительна.

ПФ является фосфорилированным производным семейства витамина В₆ – пиридоксина, пиридоксала, пиридоксамина.

Центр присоединения
фосфатной группы
с образованием кофермента

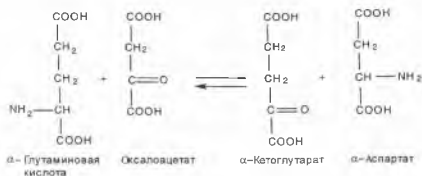


Пиридоксин

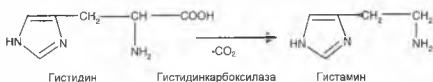
Замена верхнего радикала на СНО дает пиридоксаль, замена на СН₂НН₂ – пиридоксамин.

ПФ-зависимые ферменты можно разделить на две основные группы:

– **Аминотрансферазы** катализируют реакции переаминирования аминокислот в кетокислоты:



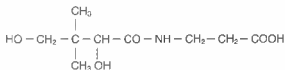
– **Декарбоксилазы аминокислот** осуществляют процессы декарбоксилирования:



Эти реакции также очень важны. Кроме медиатора воспалительных и аллергических реакций – гистамина, путем декарбоксилирования глутаминовой кислоты образуется γ -аминомасляная кислота (тормозной медиатор).

в). **Кофермент А**

Производное пантотеновой кислоты:



Пантотеновая кислота

Пантотеновая кислота состоит из пантоевой кислоты и остатка β -аланина.

Кофермент А имеет очень сложное строение. «Ручкой» является АМФ с дополнительной фосфатной группой при 3'-гидроксиле. Фосфат при 5'-углеродном атоме образует ангидридную связь с другой молекулой фосфорной кислоты, которая в свою очередь этерифицирована пантоевой кислотой. Пантоевая кислота присоединена к β-аланину, а он – к меркаптоэтиламину с помощью амидных связей, причем реакционноспособная SH-группа оказывается прикрепленной к длинной и гибкой цепи.

У кофермента А (КоА) две основные химические функции:

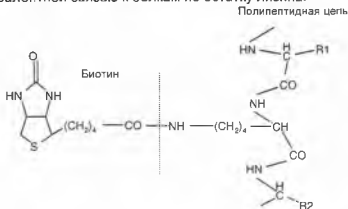
1) активация остатков R – CO – в отношении переноса путем нуклеофильного замещения;

2) активация водородного атома при атоме углерода, расположенном рядом с карбонатной группой.

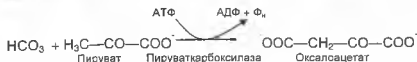
Таким образом, КоА является активатором ацетильных и ацильных группировок при их переносе или расщеплении.

г). Биотин

Биотин является простетической группой, так как прочно присоединен ковалентной связью к белкам по остатку лизина:



Биотин служит переносчиком карбоксильных групп в ряде реакций β-карбоксилирования. Например:



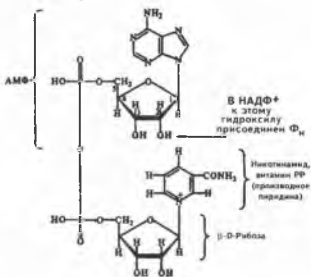
2.1.2.3. Окислительные коферменты

В состав окислительных коферментов входят особые структуры со строго определенным окислительно-восстановительным потенциалом. Коферменты этой группы выступают в роли переносчиков водорода или электронов.

Некоторые примеры таких коферментов и реакции, которые они катализируют:

а). НАД и НАДФ

Никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ) являются коферментами переноса и водорода, и электронов (e). Они легко диссоциируют от белка, то есть являются кофакторами:



НАД и НАДФ являются коферментами многих дегидрогеназ. НАД-зависимые дегидрогеназы катализируют следующие типы реакций:



Например:

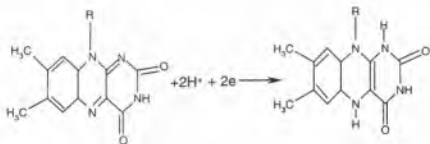


НАД является универсальным акцептором электронов в окислительных процессах энергетического метаболизма. НАДФ – универсальный донор электронов в процессах биосинтеза. В клетках имеет большое количество НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ.

б). ФАД и ФМН

Флавинадениндинуклеотид (ФАД) и флавинмононуклеотид (ФМН) являются самыми универсальными среди всех окислительных коферментов. Название не совсем отражает химическую сущность соединений, так как рибофлавин не образует гликозидной связи с Д-рибозой и таким образом ФАД, а также рибофлавин-5-фосфат (ФМН) не являются настоящими нуклеотидами.

Присоединение e^- и H^+ идет по кольцам рибофлавина:



Флавиновые коферменты ковалентно связаны с белком, представляя собой простетическую группу. Наиболее характерная реакция, катализируемая флавиновыми коферментами:



ФАД-зависимые ферменты – участники процессов окисления остатка пировиноградной кислоты в цикле Кребса (сукцинатдегидрогеназы), являются коферментами дегидрогеназ жирных кислот, моноаминоксидаз, гидроксилаз, входят в состав редуктазных комплексов дыхательной цепи переносчиков электронов.

2.2. Классификация ферментов

2.2.1. Принципы классификации

Номенклатура и классификация ферментов разработана международным биохимическим союзом (IUB). Главный ее принцип состоит в том, что ферменты называют и классифицируют в соответствии с типом катализируемой химической реакции и ее механизмом. Основные черты системы состоят в следующем:

1. Реакции и ферменты, которые их катализируют, подразделяются на шесть классов, в каждом из которых имеется несколько семейств.

2. Название фермента состоит из двух частей: первая часть – название субстрата, вторая указывает на тип катализируемой реакции и оканчивается на -аза.

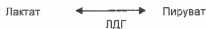
3. Дополнительная информация обычно заключается в скобки.

2.2.2. Классы и подклассы ферментов

1. Оксидоредуктазы. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Ферменты, осуществляющие окисление-восстановление за счет переноса электронов и протонов с одного субстрата на другой, обычно называют дегидрогеназами, а переносящие их непосредственно на кислород – оксидазами. Хотя в настоящее время подобное деление считается не вполне обоснованным. Сейчас оксидоредуктазы делятся на несколько подклассов, наиболее значимые из них:

а). Ферменты, действующие на группу $-CH-OH$. Обычно это НАД-зависимые редуктазы.

Например, L-лактат: НАД⁺-оксидоредуктаза (лактатдегидрогеназа, ЛДГ):



б). Ферменты, действующие на $-CH_2 - CH_2 -$ группы. Обычно это ФАД-зависимые редуктазы.

Например, сукцинат: ФАД⁺-оксидоредуктаза (сукцинатдегидрогеназа, СДГ):



в). Ферменты, действующие на группу $-CH_2-NH_2^-$.
Например, L-глутамат: НАД(Ф)⁺-оксидоредуктаза (дезаминирующая)



Дегидрогеназы участвуют в процессах энергетического катаболизма как первичные акцепторы электронов и протонов, а в процессах биосинтеза как доноры их. Оксидазы представляют собой металлопротеиды с активным центром, включающим один или несколько атомов (ионов) металла переменной валентности (Fe, Cu, Zn, Mo, Mn, Co). Часто металл входит в состав гемовых структур, представляющих собой систему порфирильных колец с расположенным в центре атомом металла (Fe, Cu). Эти ферменты играют важнейшую роль в процессе кислородного дыхания. Они способствуют как генерации активных форм кислорода (ксантиноксидаза, оксидазы аминокислот), так и их утилизации (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза) [1]. Цитохромоксидаза является конечным этапом цепи дыхательных ферментов, переносящим электроны и протоны непосредственно на кислород с образованием воды.

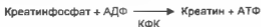
2. Трансферазы. Ферменты, катализирующие перенос групп (отличных от атома водорода) с одного субстрата на другой. Трансферазы способны к переносу одноуглеродных, альдегидных, кетонных остатков, а также ацильных, алкильных, гликозильных групп и групп, содержащих фосфор и серу.

Некоторые наиболее важные подклассы:

а). Фосфотрансферазы (киназы).

Ферменты, осуществляющие перенос остатка фосфорной кислоты.

Например, Креатинфосфат: АДФ-фосфотрансфераза (креатинфосфокиназа, КФК):



Креатинфосфокиназа строго внутриклеточно локализована и представляет собой необходимое ферментативное звено систем энергообеспечения разнообразнейших физиологических функций (мышечное сокращение, неммышечные формы подвижности, транспорт ионов через мембрану, фагоцитоз) всех позвоночных животных. Система креатин ↔ креатинфосфат участвует в регуляции ряда метаболических превращений: гликолиза, цикла Кребса, дыхания, окис-

лительного фосфорилирования, биосинтеза белка через изменение соотношения АТФ и АДФ.

Большое значение имеют ферменты, фосфорилирующие белки – протеинфосфотрансферазы (протеинкиназы). Они осуществляют перенос фосфатной группировки с АТФ на ОН-группы остатков серина, треонина, тирозина белковых молекул. В связи с этим различают серин-треониновые и тирозиновые протеинкиназы. Фосфорилирование белков – наиболее распространенный способ регуляции активности ферментов.

Протеинкиназы, в свою очередь, также являются регулируемыми ферментами. Их активность определяется скоростью образования внутриклеточных сигнальных молекул (вторичных регуляторов), в связи с чем различают ц-АМФ-зависимые, ц-ГМФ-зависимые, ДАГ(диацилглицерол)-зависимые протеинкиназы. Все протеинкиназы активируются в присутствии ионов кальция.

б). Ацилтрансферазы.

Ферменты, осуществляющие перенос ацильных и ацетильных группировок. Перенос производится обычно с помощью коэнзима А.

Например, ацетил-КоА: холин-, о-ацетилтрансфераза (холинацетилтрансфераза, ХАТ):



Ацилтрансферазы принимают участие в процессах окисления (цикл Кребса), расщепления и синтеза жирных кислот.

в). Аминотрансферазы.

Ферменты, переносящие аминогруппы. Коферментом служит пиридоксальфосфат.

Например, L-аспартат: α-кетоглутаратаминотрансфераза (аспартатаминотрансфераза, АсАТ):



Аминотрансферазы – очень важные ферменты метаболизма белков. Реакции переаминирования способствуют образованию необходимых для синтеза белка аминокислот, а также переходу части их в кетокислоты, которые, в свою очередь, могут либо вступить в процессы катаболизма, либо участвовать в глюконеогенезе (образовании глюкозы в клетке). За счет реакций переаминирования осуществляется взаимосвязь между обменом белков и углеводов.

3. Гидролазы. Ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление эфирных, сложноэфирных, пептидных и гликозидных связей, кислотных ангидридов. Подразделяются на подклассы по природе связи, подвергающейся гидролизу. Рассмотрим некоторые из подклассов гидролаз.

а). Ферменты, действующие на сложноэфирные связи (эстеразы). Например, Ацетилхолингидролаза (ацетилхолинэстераза, АХЭ):



Фермент имеет огромное значение для разрушения ацетилхолина на постсинаптической мембране. Блокирование активности АХЭ фосфорорганическими соединениями (ядами) приводит к невозможности проведения нервного импульса (параличу). Большое значение имеют также ферменты, гидролизующие фосфоэфирную связь – фосфатазы. Они участвуют в регуляции активности ферментов, осуществляя дефосфорилирование белков, фосфорилированных протеинкиназами.

б). **Гликозидгидролазы.** Гидролизуют гликозидные связи. Например: α -1,4-эндогликозидгидролаза (амилаза)



Гликозидгидролазы подразделяют на экзогликозидгидролазы и эндогликозидгидролазы, к которым относится амилаза. Они гидролизуют внутримолекулярные гликозидные связи полисахаридов. Экзогликозидгидролазы гидролизуют внешние или единственные гликозидные связи. Кроме того, данные ферменты делят в зависимости от типа гликозидной связи (α или β).

в). Ферменты, действующие на пептидную связь.

Подкласс делится на 11 подподклассов, учитывая различия между пептидазами (расщепляют олигопептиды) и протеазами (действуют на белки), выделяя также ферменты, гидролизующие дипептиды или более крупные пептиды. Также различают ферменты, действующие на концевую связь на С- или N-конце молекул. Ферменты, действующие на пептидную связь с С-конца, получили название карбоксипептидазы, а действующие с N-конца – аминопептидазы.

Протеиназы в соответствии с механизмом катализа и другими особенностями делятся на сериновые, тиоловые, металлозавис-

мые, кислые. Существуют также и другие классификации протеолитических ферментов, где учитываются локализация, строение активного центра, механизм действия, оптимум pH, функции в клетке и организме.

К сериновым протеиназам относятся: химотрипсин, трипсин, плазмин, факторы свертывания IX и XI. В активном центре этих ферментов находится серин, гидроксильная группа которого участвует в катализе [3]. Кислые протеиназы: пепсин, катепсин D, реннин из желудка теленка. Их необычным свойством является то, что они наиболее активны в интервале pH от 1 до 5. В настоящее время значение термина «катепсин» изменилось. Это название сохранилось за группой протеолитических ферментов животных клеток, которые действуют главным образом как эндопептидазы (гидролизуют пептидные связи внутри белковой молекулы) и оптимум pH которых не ограничен кислотной областью. Металлозависимые: коллагеназы, желатиназы, стрептолизины. Отличительной особенностью металлопротеаз является наличие в их активном центре двухвалентных металлов, чаще всего цинка, иногда кальция или обоих вместе [10]. Катепсины и коллагеназы локализованы в клеточных лизосомах. Их выброс из клеток в процессе воспаления приводит к расщеплению белков межклеточного матрикса. Они играют также решающую роль при развитии таких процессов, как морфогенез, миграция, дифференцировка и пролиферация клеток. Стрептолизины представляют собой ферменты агрессии бактерий (стрептококков). Тиоловые протеиназы получили название *колпаины*. Они Ca^{2+} -зависимые, в ответ на увеличение кальция могут осуществлять ограниченный протеолиз ферментов, изменяя их активность. Колпаины путем отщепления пептидов повышают сродство рецепторов к лигандам, вызывают деструкцию компонентов цитоскелета. Все колпаины инактивируются агентами, действующими на сульфгидрильные группы, что свидетельствует о их наличии в активном центре ферментов [9].

Гидролазы – один из наиболее представительных классов ферментов. К этому классу ферментов относятся ферменты, расщепляющие триглицериды, фосфолипиды, нуклеиновые кислоты, стероиды и т.п.

4. Лиазы. Ферменты, отщепляющие группы от субстратов по негидролитическому механизму с образованием двойных связей, а также присоединение групп по двойным связям. Ферменты действуют на связи C–C; C–O; C–N; C–S; C–галогид.

Рассмотрим некоторые подклассы:

а). Альдегид-лиазы.

Например, Кетозо-1-фосфат-лиаза (альдолаза):



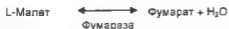
Альдольное расщепление (конденсация) является одной из наиболее типичных реакций в метаболических процессах, приводящих к расщеплению или образованию —C—C— связей. Фруктозодифосфат-альдолаза обнаружена во всех растительных и животных тканях, но отсутствует у некоторых бактерий, осуществляющих гетероферментативное молочнокислое брожение. Многие лиазы требуют для осуществления расщепления затраты энергии АТФ, при этом образуется другое макроэргическое соединение, которое делает возможным протекание обратной реакции. Наиболее распространенным является фермент цитратлиаза. В эукариотических клетках синтез цитрата протекает в митохондриях под действием цитратсинтетазы. Поступающий в цитоплазму избыток цитрата расщепляется сопряженно с гидролизом АТФ:



Обратимость реакции обеспечивает образование ацетил-КоА, имеющего макроэргическую связь.

б). Углерод-кислород-лиазы.

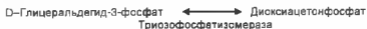
Например, L-малат-гидролиаза (фумараза):



Фумараза участвует в катаболических процессах, это фермент цикла Кребса.

5. Изомеразы. Ферменты, катализирующие взаимопревращения оптических, геометрических и позиционных изомеров.

Например, D-глицеральдегид-3-фосфаткетон-изомераза (триозофосфатизомераза):



Реакции изомеризации встречаются во всех катаболических процессах, проходящих в клетках.

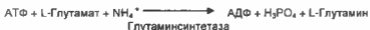
6. Лигазы. Ферменты, катализирующие соединение двух молекул, сопряженное с разрывом пиродфосфатной связи АТФ или другого макроэргического соединения.

В этот класс включены ферменты, катализирующие реакции, в ходе которых образуются связи С-О, С-S, С-N и С-С.

Некоторые подклассы:

а). Ферменты, катализирующие образование С-N связей.

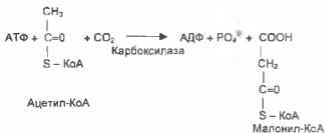
Например, L-глутамат: аммиак-лигаза (глутаминсинтетаза):



Эта реакция имеет решающее значение для включения аммоний-катионов в органические соединения.

б). Ферменты, катализирующие образование связей С-С.

Например, ацетил-КоА: CO₂-лигаза (ацетил-КоА-карбоксилаза):



Образование малонил-КоА очень важно для реакций биосинтеза жирных кислот.

2.3. Регуляция активности ферментов

Регуляция активности ферментов, определяющая скорость протекания и направленность процессов в клетках, является основным механизмом поддержания клеточного гомеостаза (относительного динамического постоянства химического состава и процессов в клетке). Процессы регуляции ферментативной активности сложны и разнообразны.

разны, но все же их можно подразделить на две большие группы: непосредственное изменение активности ферментов и изменение количества ферментов. В каждой из этих групп можно выделить более мелкие подгруппы.

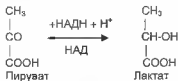
2.3.1. Регуляция каталитической активности ферментов

1). Локальные изменения pH в клетке за счет работы ионных каналов и деления клетки на отсеки (компартиментализация).

Быстрые и кратковременные изменения соотношения протонов могут ускорять или замедлять протекание конкретных реакций в определенном участке клетки. Это происходит за счет изменений степени ионизации функциональных групп активного центра, самой молекулы субстрата, а также отдельных аминокислотных остатков в белковой молекуле, что влияет на скорость ферментативного катализа.

2). Регуляция за счет изменения концентраций реагентов: субстратов, коферментов.

В данном случае регуляция обеспечивается образованием продуктивных и непродуктивных комплексов, ингибирования избытком продукта, если он не удаляется из сферы микроокружения фермента. Например: фермент лактатдегидрогеназа катализирует обратимую реакцию превращения лактата в пируват:



Образование непродуктивных комплексов типа фермент-НАД-пируват или фермент-НАДН-лактат приведет к сдвигу равновесия в ту или иную сторону. Ингибирование ферментативной активности продуктом возможно и в односубстратной реакции, если структурно продукт сходен с субстратом. Тогда при избытке продукта образуются непродуктивные комплексы фермент-продукт, и скорость превращения субстрата в продукт снижается.

3). Аллостерическая регуляция.

Сущностью аллостерической регуляции является способность низкомолекулярных веществ – эффекторов – связываться с аллостерическим центром фермента, что сопровождается изменением

его конформации и активности. Аллостерическим регулятором может служить и один из субстратов, способный связываться сразу двумя центрами. Например, фосфофруктокиназа способна связывать АТФ как по активному, так и по аллостерическому центру. Таким образом, если АТФ присутствует в низкой концентрации, то связь осуществляется в основном по активному центру и идет второе фосфорилирование фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат. Если же концентрация АТФ возрастает, становится возможным связывание его с аллостерическим центром помимо активного, что приводит к изменению конформации фосфофруктокиназы и снижению скорости второго фосфорилирования фруктозо-6-фосфата.

Ингибирование фермента, катализирующего одну из реакций в цепи, конечным продуктом (аллостерический регулятор) этой цепи называют *ингибированием по принципу обратной связи*.

Примерами ингибирования по принципу обратной связи у микроорганизмов может служить ингибирование ферментов начальных реакций биосинтеза конечным продуктом.

Например, фосфорибозил-АТФ-пирофосфорилазы – гистидином; антранилатсинтетазы – триптофаном; аспартаттранскарбоамилазы – цитидинтрифосфатом.

Более тонкая регуляция осуществляется с помощью *множественных петель обратной связи*.

Существует несколько вариантов ингибирования по принципу обратной связи:

а). Кумулятивное ингибирование.

Ингибирующее действие двух или более конечных продуктов на один и тот же регулируемый фермент суммируется.

б). Согласованное или мультивалентное ингибирование.

Полное ингибирование наблюдается только тогда, когда в избытке одновременно присутствуют два или более конечных продукта.

в). Кооперативное ингибирование.

Ингибирующее воздействие кооперативно взаимоусиливается конечными продуктами, превосходя кумулятивный эффект.

Первоначально аллостерический механизм регулирования никак не связывали с олигомерной организацией ферментов. Однако в последующем был предложен механизм аллостерических переходов субъединиц для олигомерных ферментов. Этот механизм получил название согласованной модели аллостерии [12]. Согласно этой модели олигомер может существовать по крайней мере в двух находящихся в равновесии конформационных состояниях, причем состояние R (релаксированное) связывает субстрат сильнее, чем состояние T

(напряженное). Переход из одного состояния в другое у всех протомеров олигомерного фермента происходит одновременно и согласованно при связывании первой молекулы субстрата. При этом увеличивается скорость связывания других молекул субстрата с перешедшим в R-состояние протомером.

Для ферментов, обладающих субъединичной структурой, в определенных условиях характерен распад на субъединицы (диссоциация). Известны также случаи склонности ферментов к образованию ассоциатов большего размера, чем исходные молекулы [4, 8]. Все это приводит к изменениям активности ферментов. Для регуляции активности в данных случаях очень важными являются типы структур, образующихся при ассоциации белковых молекул; характер распределения ферментативной активности между субъединицами или олигомерами; влияние специфических лигандов на положение равновесия между олигомерными формами; скорость установления этого равновесия. Положение равновесия между олигомерными формами фермента может контролироваться присутствием специфических лигандов (субстратов, аллостерических регуляторов). Связывание специфического лиганда приводит к конформационным изменениям белковой молекулы, затрагивающим центры ассоциации, ответственные за белок-белковые взаимодействия. Примером может служить ассоциация димеров мышечной гликогенфосфорилазы *b* в тетрамеры под действием аллостерического активатора – АМФ. Примером регуляции активности при диссоциации тетрамера является распад тетрамера протеинкиназы А на каталитические и регуляторные димеры при присоединении к регуляторным центрам последних аллостерического активатора – цАМФ.

4). Регуляция с помощью пространственного разобщения (компарментализация).

Локализация специфических метаболических процессов в различных отсеках или органоидах клетки способствует их более тонкой и независимой регуляции. Однако возникают проблемы сопряжения процессов метаболизма. Осуществляется это с помощью «челночных механизмов» или «шунтов» через метаболиты, легко проникающие сквозь мембраны. При изучении метаболических процессов мы познакомимся с подобными механизмами сопряжения.

В реальных биохимических системах, каковыми являются клетки, реализуется адсорбционный механизм регуляции активности ферментов. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что ферменты способны обратимо связываться с мембранами клеток, цитоскелетом и между собой [4]. Причинами изменения каталитических и регулятор-

ных свойств ферментов при адсорбции на субклеточных структурах служат изменения конформации активных и регуляторных центров, микроокружения фермента. Адсорбированные ферменты могут обеспечивать компартиментализацию метаболитов у поверхности субклеточных структур, на которых адсорбированы эти ферменты.

Внутри компартментов ферменты, катализирующие многоступенчатый метаболический путь, объединены в макромолекулярные комплексы – метаболоны [11]. Это позволяет канализировать перемещение интермедиатов по метаболическому пути. Конформационные изменения в одном из компонентов могут передаваться через белок-белковые взаимодействия на другие компоненты комплекса, что усиливает регуляторные эффекты. Сборка метаболонов происходит на клеточных структурах (подложка). Например, в эритроцитах гликолитический метаболон собирается на интегральном мембранном белке – белке полосы 3. Метаболон цикла трикарбоновых кислот собирается на внутренней мембране митохондрий. Ключевую роль при сборке метаболона играет адсорбция α -кетоглутаратдегидрогеназного комплекса на мембране. В состав якорной площадки (подложки) входит один из ферментов цикла – сукцинатдегидрогеназа, являющаяся интегральным белком внутренней мембраны митохондрий.

5). Ковалентная модификация ферментов.

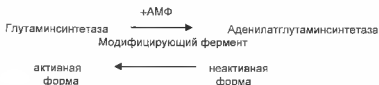
Изменение скорости протекания ферментативных реакций происходит при обратимой химической модификации белковой молекулы. Наиболее распространенной ковалентной модификацией, на которой основана регуляция многих процессов метаболизма, является фосфорилирование. Фосфатные группировки переносятся с АТФ с помощью протеинтрансфераз (протеинкиназ) на аминокислотные остатки серина, треонина и реже тирозина молекул фермента. Ещё реже встречается фосфорилирование по остаткам гистидина (у растений). Дефосфорилирование осуществляют ферменты фосфатазы. Фосфорилирование происходит в высшей степени избирательно и затрагивает небольшое число (1–3) остатков.

Фосфорилирование как способ регуляции часто сочетается с аллостерической регуляцией [4]. Активность мышечной гликогенфосфорилазы регулируется как путем ковалентной модификации (фосфорилирование–дефосфорилирование), так и действием специфических аллостерических регуляторов. Фосфорилирование катализируется ферментом киназой фосфорилазы, а обратный процесс (дефосфорилирование) – специфической фосфатазой. Фосфорилированную (активную) форму фосфорилазы называют фосфорилазой *a*, а дефосфорилированную – фосфорилазой *b*. Фосфорилаза *b* для

проявления активности требует присутствия АМФ (аллостерический активатор) и ингибируется по аллостерическому механизму АТФ, АДФ и глюкозо-6-фосфатом.

Кроме фосфорилирования, может происходить ацетилирование (присоединение остатков уксусной кислоты) и аденилирование (присоединение остатков аденина). Чаще встречается у бактерий.

Например, глутаминсинтетаза *E. coli* существует в двух формах: аденилированной и деаденилированной:



Ацетилирование цитратлиазы встречается у фотосинтезирующей бактерии *Rhodospseudomonas gelatinosa*. В данном случае активна ацетилированная форма фермента.

б). Регуляция с помощью изоферментных форм.

Изоферменты – ферменты, катализирующие одну и ту же реакцию, но различающиеся по кинетическим характеристикам: v_{max} , K_m .

Они могут отличаться по субъединичному составу, по сродству к определенному коферменту. Изоферменты действуют в различных компартментах клетки: цитозоле, митохондриях. А также различные изоферментные формы могут встречаться в различных клетках. Например, гексокиназа из гепатоцитов обладает невысоким сродством к глюкозе, K_m составляет около 5 мМ/л. Гексокиназа из нейронов обладает в 100 раз более высоким сродством к глюкозе; $K_m=0,05$ мМ/л. Это позволяет нейронам утилизировать глюкозу при достаточно низком ее содержании в межклеточной жидкости. Другим примером является наличие в клетках млекопитающих по крайней мере пяти изоферментных форм фермента лактатдегидрогеназы. Данный фермент представляет собой тетрамер, состоящий из субъединиц двух типов. Первый тип субъединиц получил обозначение М (от *mus* – мышца), а второй Н (от *hard* – сердце). Изоферментные формы лактатдегидрогеназы различаются по субъединичному составу: 4М – ЛДГ₅; 3М1Н – ЛДГ₄; 2М2Н – ЛДГ₃; 1М3Н – ЛДГ₂; 4Н – ЛДГ₁. ЛДГ₅ в наибольшем количестве содержится в мышечной ткани, фермент обладает наивысшим сродством к пирувату и НАДН, поэтому реакция, им катализируемая, идет преимущественно в сторону образования

молочной кислоты. ЛДГ₁ содержится только в кардиомиоцитах, фермент проявляет наибольшее сродство к лактату и НАД, соответственно катализируется реакция превращения молочной кислоты в пировиноградную. Промежуточные изоферменты также различаются по сродству к субстратам, но менее выражено. В одинаковой степени сродство к пирувату и лактату, восстановленной и окисленной формам НАД проявляется у ЛДГ₃. Существование двух крайних изоферментных форм ЛДГ имеет большой регуляторный смысл. Кардиальный изофермент, обладающий высоким сродством к молочной кислоте, не позволяет ей накапливаться в сердечной мышце и стимулирует дальнейшее окисление пировиноградной кислоты. Возможность же образования значительного количества молочной кислоты под действием ЛДГ₅ в мышечной ткани приводит к раздражению ею рецепторов и формированию чувства утомления. Развивающееся чувство утомления позволяет мышце перейти к отдыху для успешного ресинтеза АТФ.

7). Регуляция с помощью ограниченного протеолиза.

Многие ферменты синтезируются в виде проферментных форм – проферментов. Переход в активную форму связан с отщеплением пептида, что ведет к активации фермента. Примером такого типа активации служат протеолитические ферменты, которые синтезируются в виде проформ. Отщепление пептида обычно активируется либо неорганическими катализаторами (соляная кислота), либо другими протеолитическими ферментами. При образовании нескольких активных молекул фермента дальнейшая активация осуществляется аутокаталитически. Протеолитический фермент желудочного сока синтезируется в виде предшественника – пепсиногена. Сначала пепсиноген активируется соляной кислотой, а затем процесс совершается аутокаталитически. То есть активный пепсин сам катализирует отщепление пептида от молекул вновь синтезируемого пепсиногена. Подобным образом осуществляется активация и других протеолитических ферментов. Однако есть примеры активации с помощью ограниченного протеолиза и непротеолитических ферментов. Например, считается, что фермент супероксиддисмутаза синтезируется в виде предшественника. В определенной ситуации происходит отщепление пептида от проформы фермента с помощью специфической протеазы, что приводит к превращению предшественника в активный фермент [1].

С помощью ограниченного протеолиза регулируется активность ферментов свертывающей и противосвертывающей систем крови, системы белков комплемента, находящихся в плазме крови и участвующих в осуществлении иммунных реакций.

2.3.2. Регуляция количества ферментов

Более медленной, но не менее эффективной регуляцией скорости ферментативных реакций является регуляция их синтеза и распада.

Все ферменты, синтезируемые клеткой, можно разделить на три группы.

1. Ферменты, синтез которых идет с постоянной скоростью. Постоянной является и скорость их распада, благодаря чему количество этих ферментов в клетках поддерживается на постоянном уровне. Они называются *конститутивными*. Конститутивными являются большая часть ферментов эукариотических клеток, часть ферментов прокариотических клеток.

2. Ферменты, имеющиеся в клетке в небольшом количестве, но содержание которых повышается в сотни раз при действии индукторов. Такие ферменты получили название *частично индуцибельных*. У эукариот – это ферментативная система гидроксилаз (цитохромы P-450), расщепляющие ксенобиотики (гепатоциты, эндоплазматическая сеть); у прокариот индуцибельных ферментов много.

3. Ферменты, появляющиеся в клетке только в присутствии определенных индукторов. Их называют *полностью индуцибельными*. Такие ферменты характерны для прокариотических клеток.

Репрессия синтеза индуцибельных ферментов осуществляется с помощью определенных репрессорных белков, а дерепрессия – с помощью индукторов. У прокариот индукторами являются метаболиты, открывающие синтез ферментов естественной утилизации. Это явление получило название *координированной индукции*. Если определенный метаболит (например, аминокислота) находится в среде в достаточном количестве, то образование ферментов его синтеза у прокариот блокируется самим метаболитом, который в этом случае выступает *корепрессором*.

Например, добавление гистидина в среду, на которой растет бактерия *Salmonella thyphimurium*, подавляет синтез всех ферментов биосинтеза гистидина; добавление в среду лейцина репрессирует синтез трех первых ферментов, входящих в состав оперона, участвующих в синтезе только лейцина.

Если процессы синтеза белка и его регуляция достаточно хорошо изучены, то процессы распада и особенно регуляция их изучены еще недостаточно. Распад ферментов связан с регуляцией протеолитической активности, что сопряжено с расходом АТФ, так как процесс

осуществляется через специфические протеинкиназы. Чувствительность фермента к протеолизу определяется его конформацией, присутствием или отсутствием кофермента, ионов металлов, субстратов.

Содержание ферментов в клетках высших организмов может изменяться под действием различных информационных молекул: гормонов, ростовых факторов. Информационными молекулами, влияющими на количество ферментов в клетке, являются гормоны стероидной природы, тиреоиды, ретиноиды.

Возможно также, что регуляция активности ферментов может зависеть от эффективности процессов фолдинга (формирование третичной структуры) функционально важных белков в клетке, однако эти вопросы еще требуют тщательного изучения.

ГЛАВА ТРЕТЬЯ УГЛЕВОДЫ

Простейшие сахара (моносахариды) и их олигомеры и полимеры (полисахариды) составляют один из главных классов клеточных компонентов, объединенных под общим названием *углеводы*.

3.1. Моносахариды

Моносахариды подразделяются на полиоксиальдегиды (альдозы) и полиоксикетоны (кетозы). Карбонильная группа обладает высокой реакционной способностью, типичной реакцией является присоединение групп, содержащих избыточные электроны, в частности – OH-группы. Если сахарная цепочка достаточно длинна (4-6 атомов углерода), к карбонильной группе может присоединиться одна из гидроксильных групп той же молекулы с образованием циклического полуацетала, находящегося в равновесии со свободной альдегидной или кетонной формой (рис.3.1).

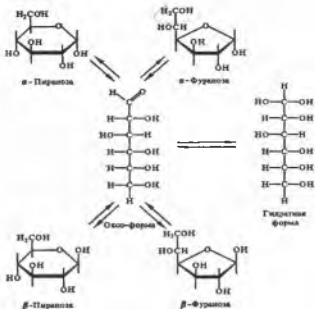
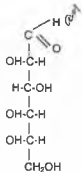


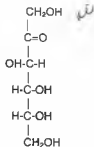
Рис. 3.1. Различные формы глюкозы в водном растворе [1]

При циклизации сахаров возникает новый хиральный центр при атоме углерода, ранее входившего в состав карбонильной группы. Две конфигурации относительно этого атома обозначаются как α - и β -конфигурации. Равновесие для большинства сахаров сдвинуто в сторону образования циклических форм. Сахара содержат несколько хиральных атомов, и различным диастереоизомерам даны разные названия. Так, глюкоза, манноза и галактоза – это попросту три из восьми возможных диастереоизомеров альдогексоз.

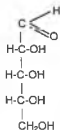
Моносахариды относятся к D- или L-форме в зависимости от конфигурации относительно хирального центра, наиболее удаленного от карбонильной группы (рис.3.2). Если в молекулах сахаров, ориентированных по правилу Фишера, OH-группа при этом атоме углерода находится справа, то сахар относят к D-семейству.



L-Глюкоза



D-Фруктоза

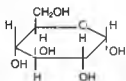


D-Рибоза

Рис. 3.2. Структурные формулы некоторых сахаров (моносахариды) согласно правилу Фишера [4]

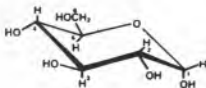
Шестичленные кольца получили название *пиранозных*, а пятичленные – *фуранозных*. Естественная тенденция пяти- и шестиуглеродных сахаров к циклизации обеспечивает образование устойчивых соединений из чрезвычайно реакционноспособных неустойчивых мономеров.

Чтобы упростить изображение конфигурации циклических сахаров, частично применяют *структурные формулы Хеурса*:



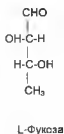
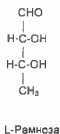
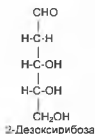
α-D-Глюкопираноза

Большинство сахаров имеет конформацию кресла, при которой большая часть замещающих групп располагается в плоскости экватора молекулы, образованной атомом кислорода и 1-3 атомами углерода:

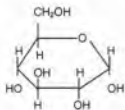


Моносахариды – химически реакционноспособные соединения. Восстановление карбонильной группы сахаров (например, боргидридом натрия) приводит к образованию сахарного спирта, например, рибита (восстановление рибозы), ксилита (восстановление ксилозы), сорбита (восстановление глюкозы). Альдегидные группы альдоз могут окисляться множеством реагентов, образуя карбоновые кислоты, известные как альдоновые кислоты. Благодаря этому в щелочной среде альдозы восстанавливают ионы двухвалентной меди до закиси меди, ионы серебра – до свободного металла, феррицианида – до ферроцианида.

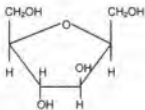
Многие производные сахаров встречаются в природе. Среди них можно назвать альдонские кислоты (например, 6-фосфоглюконовая кислота), а также уруновые кислоты, содержащие концевую COOH-группу (например, глюкуроновая кислота). Гидроксильная группа во втором положении молекулы глюкозы может быть замещена на NH₂-группу с образованием 2-амино-2-дезоксиглюкозы, обычно именуемой глюкозамином. Широко распространены дезоксисахара:



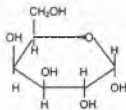
Наибольшее значение из моносахаридов имеют гексозы – глюкоза, фруктоза, галактоза:



α -D-Глюкоза
(пиранозная форма)

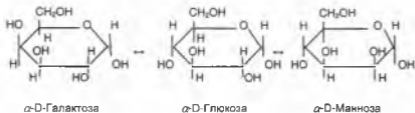


α -D-Фруктоза
(фуранозная форма)



α -D-Галактоза
(пиранозная форма)

Изомеры, различающиеся по конфигурации положением групп -H и -OH при втором, третьем и четвертом атомах углерода, называются *эпимерами*. Биологически наиболее важными эпимерами глюкозы являются манноза и галактоза:



В клетке они находятся в фосфорилированной форме, в виде 1- или 6-фосфатов. Основное их назначение – расщепление в энергетическом катаболизме. Несмотря на небольшую энергоёмкость по сравнению с жирными кислотами, моносахариды используются клеткой предпочтительнее, так как более легко окисляемы, а также потому, что их окисление не сопряжено с образованием токсичных промежуточных метаболитов. Расщеплению подвергается глюкоза, остальные гексозы в нее превращаются, а затем расщепляются. Глюкоза выбрана в процессе длительной эволюции, вероятно, потому, что именно она наименее реакционноспособна и в растворе на 80-90% находится в циклической форме (в виде полуацетала). Сниженная реакционная активность глюкозы предохраняет клетку от нежелательных химических нерегулируемых реакций.

Другие важные в организмах моносахариды, принимающие участие в промежуточном обмене:

	<i>Альдозы</i>	<i>Кетозы</i>
Триозы (C ₃ H ₆ O ₃)	Глицероза	Дигидрооксиацетон
Тетрозы (C ₄ H ₈ O ₄)	Эритроза	Эритрулоза
Пентозы (C ₅ H ₁₀ O ₅)	Рибоза, ксилоза	Ксилулоза

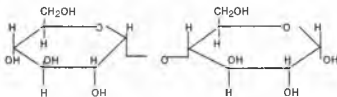
Конденсация моносахарида с гидроксильной группой другого соединения (другого моносахарида или вещества неуглеводной природы) приводит к образованию *гликозидов*. Гликозидную связь называют ацетальной, так как она образуется в результате реакции между полуацетальной группой и OH-группой. Гликозиды найдены в составе многих лекарственных средств и пряностей. Из наперстянки выделен гликозид *убаин* – ингибитор Na⁺,K⁺-АТФ-азы. К числу гликозидов от-

Носится ряд антибиотиков, в частности стрептомицин. Гликозидная связь лежит в основе образования ди-, олиго- и полисахаридов.

3.2. Дисахариды

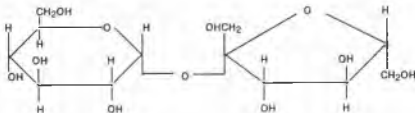
Дисахариды представляют собой сахара, состоящие из двух моносахаридных остатков, соединенных гликозидной связью. Физиологически важными дисахаридами являются мальтоза, сахароза, лактоза и трегалоза.

Мальтоза – это дисахарид, образующийся при гидролизе амилозы (линейный полимер крахмала). Два остатка глюкозы в мальтозе связаны α -1,4-гликозидной связью:



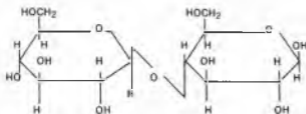
Так как в мальтозе остается возможность освобождения альдегидной группировки, она относится к восстанавливающим дисахаридам.

Сахароза – дисахарид, сформированный из остатков глюкозы и фруктозы. Синтезируется в растительных клетках. В больших количествах содержится в корнеплодах сахарной свеклы, в сахарном тростнике и других растительных объектах. Остатки глюкозы и фруктозы связаны β -1,2-гликозидной связью:



Так как оба реакционноспособных атома углерода связаны, сахароза относится к невосстанавливающим сахарам.

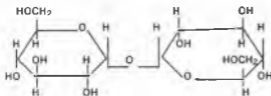
Лактоза – это молочный сахар, состоящий из остатков глюкозы и галактозы, связанных между собой β -1,4-гликозидной связью:



Лактоза (β -1,4-гликозидная связь)

Лактоза является восстанавливающим сахаром (есть свободный полуацетальный атом углерода).

Трегалоза – дисахарид, состоящий из двух остатков глюкозы, связанных α -1,1-гликозидной связью. Трегалоза синтезируется грибами. Является невозстанавливающим сахаридом:



Трегалоза (α -1,1-гликозидная связь)

В составе полисахарида целлюлозы можно выделить как структурное звено дисахарид целлобиозу, в которой два остатка глюкозы связаны β -1,4-гликозидной связью.

В клетках и организмах роль дисахаридов – служить запасным энергетическим соединением и строительным материалом для создания полисахаридов.

3.3. Олигосахариды

Олигосахаридами называются углеводы, молекулы которых состоят из небольшого числа моносахаридных звеньев (от 3 до 8-10).

Олигосахариды широко распространены в природе, встречаются в животных, растительных клетках и в клетках микроорганизмов. Большинство олигосахаридов служат источниками энергии, но ряд могут выполнять и специфические функции. Например, олигосахариды молока играют важную роль в явлениях иммунитета. Классифицируют олигосахариды в зависимости от количества остатков моносахаров: трисахариды, тетрасахариды и т.д. Другой принцип классификации основан на наличии в молекуле остатков одного моносахарида (гомоолигосахариды) или же присутствии различных моносахаридных звеньев (гетероолигосахариды). Олигосахариды могут иметь прямую или разветвленную полигликозидную цепь. О прямой цепи говорят тогда, когда каждый моносахаридный остаток связан своим спиртовым гидроксилом не более чем с одним моносахаридным остатком. К олигосахаридам с прямой цепью относится мальтотриоза, образующийся при гидролизе крахмала трисахарид. Примером олигосахаридов с разветвленной цепью может служить изомальтотриоза, у которой к среднему остатку глюкозы присоединены два других остатка через 4-й атом углерода (4-1 связь) и через 6-й атом углерода (6-1 связь). Олигосахариды делят также на две большие группы в зависимости от наличия свободной альдольной группировки на восстанавливающие и невосстанавливающие олигосахариды. К восстанавливающим олигосахаридам относятся мальтотриоза, целлотриоза, а к невосстанавливающим – трегалоза.

Олигосахариды растворимы в воде, однако по мере увеличения моносахаридных звеньев их растворимость в воде быстро падает. Важнейшими химическими реакциями олигосахаридов являются: гидролиз гликозидных связей, реакции полуацетального гидроксила у восстанавливающего моносахарида и реакции спиртовых групп всех моносахаридных остатков. Реакции полуацетального гидроксила, способного переходить в карбонильную группу, спиртовые группы олигосахаридов так же, как и у моносахаров, дают простые и сложные эфиры.

3.4. Полисахариды

Полисахариды, в отличие от моносахаридов и дисахаридов, нерастворимые или труднорастворимые в водных средах соединения, не имеющие сладкого вкуса.

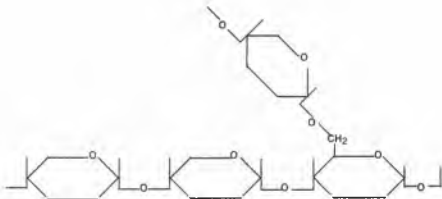
Систематической номенклатуры полисахаридов не существует. Обычно их называют гликанами. Встречаются гликаны с линейной полигликозидной цепью и разветвленной. За основу названия берется название моносахарида или моносахаридов, входящих в состав. Например, полисахариды на основе D-глюкозы называются D-гликанами. Используются и сохранившиеся тривиальные названия. Так, мукополисахаридами обычно называются полисахариды, содержащие аминсахара и уроновые кислоты.

Полисахариды составляют большую часть массы растений, содержатся также в животных организмах и у микроорганизмов. Функции полисахаридов исключительно разнообразные. Наиболее распространенными являются опорная и резервная функции. В состав клеточных стенок растений входит целлюлоза, грибов – хитин. Хитин также формирует наружные покровы членистоногих. Ряд полисахаридов сложного состава и строения обнаруживается в экстрацеллюлярном (внеклеточном) матриксе соединительной ткани животных: гепарансульфаты, дерматансульфаты. Значительной является также функция полисахаридов как запасных питательных соединений, поставляющих для клетки основные энергетические метаболиты – моносахара. К запасным полисахаридам относятся крахмал растительных клеток, гликоген животных и грибных клеток, крахмалоподобные и гликогенподобные соединения бактерий. У некоторых растений и микроорганизмов запасные функции выполняют фруктозаны, глюкоманнаны, инулин. Особенно важной функцией полисахаридных остатков, связанных с белками или липидами, является их роль в определении антигенной специфичности клеток и вирусных частиц. Углеводные остатки клеточных рецепторов служат для распознавания специфических информационных молекул: гормонов, медиаторов, цитокинов (информационные молекулы, участвующие в реализации иммунного ответа). У отдельных полисахаридов сложного состава есть специфические функции. Так, гепарин – природный антикоагулянт – предотвращает свертывание крови в сосудах; ганглиозиды мозга играют важную роль в проведении нервного импульса.

Полисахариды можно подразделить на гомополисахариды (состоят из множества остатков одного и того же моносахарида) и гетерополисахариды (состоят из разных мономеров).

Гомополисахариды. К гомополисахаридам относятся такие биологически важные углеводы, как крахмал, гликоген, целлюлоза, гранулеза.

Крахмал – гомополисахарид растительного происхождения. Синтезируется из глюкозы в качестве запасного энергетического соединения. Крахмал состоит из двух основных компонентов: более легко-растворимой, спиральной неразветвленной амилозы (15-20%), в которой остатки глюкозы связаны α -1,4-гликозидной связью; трудно-растворимого, разветвленного амилопектина (80-85%), имеющего как α -1,4-, так и α -1,6-гликозидные связи. Линейные участки цепи составляют 24-30 остатков глюкозы:



Существуют два типа амилоз: амилозы с относительно низкой степенью полимеризации (порядка 2000 остатков глюкозы) и большой степенью полимеризации (свыше 6000 остатков). Средняя молекулярная масса различных амилоз колеблется от 100 тыс. (кукурузная и рисовая) до 400 тыс. (картофельная).

Амилопектины еще более высокомолекулярны и гетерогенны, чем амилозы. Молекулярная масса амилопектинов может достигать порядка 5×10^8 Да. Молекула амилопектина построена как бы из сочетания гроздьев, похожих на кисть винограда. Здесь имеются компактные области с упорядоченной структурой, обладающие кристаллическостью, медленно гидролизующиеся и менее упорядоченные участки, богатые точками ветвления. Отсутствие кристалличности в этой области приводит к ее более быстрой гидролизуемости.

Крахмалоподобные соединения. Из красных водорослей был выделен крахмал, не содержащий амилозы и окрашивающийся иодом в красно-фиолетовый цвет. Из зеленых водорослей также выделяется полисахарид типа амилопектина, он дает темно-красное ок-

рашивание с иодом. Крахмалоподобные соединения, похожие на растительный крахмал и дающие синюю окраску с иодом, синтезируют парамеции и бактерии.

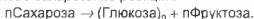
Гликоген – запасной полисахарид животных и грибных клеток, а также ряда бактерий. Гликоген отличается от крахмала более разветвленной структурой, чем амилопектин, линейные участки цепи представлены 11-18 остатками глюкозы. Молекулярная масса гликогенов обычно очень высокая и лежит в пределах 10^7 - 10^9 Да. Форма молекулы приближается к сферической.

Исследования гликогенов различных видов животных приводят к заключению, что большинство этих полисахаридов имеют среднюю длину цепи 10-14 глюкозных остатков, среднюю длину наружных ветвей – 6-9 остатков; среднюю длину внутренних цепей – 3-4 остатка.

Макромолекулярная структура гликогена представляет собой частицу размером от 20 (самые мелкие) до 200 мкм (самые крупные). Самые крупные (альфа-частицы) легко распадаются на более мелкие (бета- и гамма-частицы). Крупные частицы формируются из-за того, что когда молекула гликогена вырастает до определенного размера, организованного в сферу, дальнейший рост ее прекращается, но отдельные ее ветви продолжают расти и ветвиться, что дает начало новым субчастицам.

Легкость распада на отдельные субчастицы определяется ослаблением отдельных α -1,6-гликозидных связей вследствие раскачивания гликозидных цепей из-за теплового движения. В настоящее время установлено, что цепью, связывающей сферические структуры гликогена, может быть не только полисахаридная цепь, но и пептидная. Это подтверждается необходимостью наличия белка «затравки», несущего олигосахаридные остатки для эффективного синтеза гликогена в клетке.

Декстраны – группа глюканов, синтезирующихся бактериями. Например, *Leuconostoc mesenteroides* синтезирует линейную 1,6-поли-D-глюкозу (декстран). У некоторых видов бактерий декстраны содержат ветви, присоединенные посредством α -1,3- и α -1,4-гликозидных связей. Синтез декстранов может осуществляться (стрептококки) на основе сахарозы по реакции:



Ряд декстранов проявляют антигенные свойства. Декстранами также называют вещества, образующиеся в ходе гидролиза крахмала на начальных стадиях.

Целлюлоза – наиболее распространенный полисахарид, основной компонент клеточной стенки растений, а также входит в состав покровов оболочников и внешних структур бактерий. Представляет собой нерастворимое в воде соединение, состоящее из остатков глюкозы, связанных β -1,4-гликозидной связью. Полимер имеет линейную структуру – вытянутые цепи, стабилизированные водородными связями. Молекулы целлюлозы образуют элементарные фибриллы, содержащие несколько десятков линейных молекул, которые хорошо видны в электронный микроскоп. Микрофибриллы целлюлозы вместе с гемицеллюлозой, пектиновыми веществами и лигнином формируют клеточную стенку растительных клеток.

Свойства целлюлозы зависят от конформации моносахаридных звеньев, а также от относительной конформации пар мономеров (целлобиозы), которые на протяжении всей цепи определяют ее форму.

Многие млекопитающие (в том числе человек) не имеют фермента, расщепляющего β -связи (целлюлаза) и не способны использовать целлюлозу с энергетической целью. Целлюлаза – обычный фермент для бактерий и некоторых простейших, которые являются обитателями кишечника травоядных или почвенными сапрофитами.

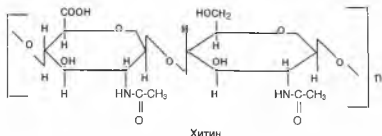
Гемицеллюлозы не относятся к целлюлозам, их разделяют на гемицеллюлозы А и В. К гемицеллюлозам А относят ксиланы, арабиноксиланы, маннаны, глюкоманнаны. К гемицеллюлозам В принадлежат пектиновые вещества: метилглюкуроноксиланогликаны, галактаны, арабинаны.

Клеточные стенки дрожжей содержат полимеры маннозы – **маннаны**; в них от главной α -1,6-цепи отходят короткие ветви (из одного-трех маннозных звеньев), соединенные α -1,2- и α -1,3-связями. Кроме целлюлозы, все растения содержат **ксиланы**, которые состоят преимущественно из β -1,4-ксилопиранозных цепей. Ксилоза, представляющая собой пятиуглеродный сахар, в этом полимере принимает форму шестичленного кольца. С другой стороны, **фруктоза**, шестиуглеродный сахар, в инулине, запасном полисахариде иерусалимского артишока, присутствует в форме пятичленного фуранозного кольца.

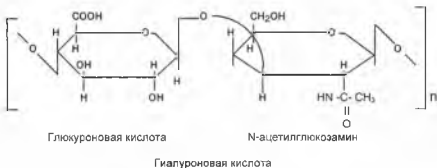
Ламинарин – резервный полисахарид бурых водорослей. При неполном гидролизе образует дисахарид ламинарибиозу, в которой глюкозные остатки соединены β -1,3-гликозидной связью.

Хитин – важный структурный полисахарид беспозвоночных животных и грибов. Мономерным звеном хитина является N-ацетил-D-

глюкозамин, остатки которого соединены β -1,4-гликозидными связями:



Гетерополисахариды. Повторяющимися единицами у данных полисахаридов являются мономеры разного типа. Примерами гетерополисахаридов могут служить глюкозаминогликаны (мукополисахариды): гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты – компоненты экстрацеллюлярного матрикса соединительной ткани. Гиалуроновая кислота – это полимер, в котором чередуются глюкуроновая кислота и N-ацетилглюкозамин:



Хондроитинсульфаты и дерматансульфаты имеют аналогичное строение, но в первом случае в состав полисахарида входит N-ацетилгалактозамин, а во втором – α -L-идуронозная кислота; кроме того, при 6-м углеродном атоме располагаются сульфозфирные группы.

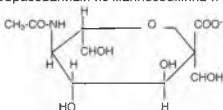
Гепарин – мукополисахарид, обладающий антикоагуляционными свойствами. Секретируется тучными клетками, присутствующими в печени, легких и других тканях. Он имеет линейную структуру и состоит из двучленных звеньев – [уронозная кислота-(1,4)-N-ацетилглюкозамин-2,6-дисульфат]_n.

3.5. Пептидогликаны и гликопротеиды

Многие гетерополисахариды в действительности являются *протеогликанами*, в которых концевое звено полисахарида ковалентно присоединено через *о*-гликозидную связь к сериновому остатку в белке. К белкам подобным образом присоединяются хондроитинсульфаты, дерматансульфаты, гепарин. Сахарные цепи могут быть присоединены к белкам (кроме гидроксильных групп серина) также через *ОН* треонина, оксализина (только в коллагене) или через *N*-гликозидную связь к амидному азоту аспарагина.

Гликопротеидами являются некоторые ферменты, гормоны, структурные белки, рецепторные белки. Углеводный компонент гликопротеидов может быть более коротким или длинным (до 15 звеньев), в состав которых входит манноза, галактоза, *N*-ацетилглюкозамин, *N*-ацетилгалактозамин, арабиноза, ксилоза, фукоза, сиаловые кислоты. Глюкоза в полностью сформированных (зрелых) гликопротеидах не обнаруживается (за исключением коллагена). Гликопротеиды, в отличие от протеогликанов, не содержат уроновых кислот.

Сиаловые кислоты являются *N*- или *O*-ацетил производными нейраминной кислоты, которая в свою очередь представляет собой деятиуглеродный сахар, образованный из маннозоамина и пирувата:



N-ацетилнейраминная кислота (одна из сиаловых кислот)

Сиаловые кислоты, кроме гликопротеидов, входят в состав ганглиозидов.

Пептидогликаны, в частности *мурейн*, являются типичными компонентами клеточных стенок большинства бактерий. Мурейн представляет собой высокомолекулярный полимер, состоящий из линейных звеньев повторяющихся компонентов: *N*-ацетилглюкозамина и *N*-ацетилмурамовой кислоты, прочно сшитых поперечными пептидными цепочками из *L*-*D*-аминокислотных остатков:

N-ацетилглюкозамин

N-ацетилмурамовая кислота

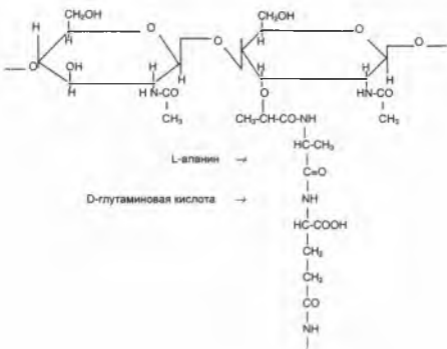


Рис. 3.3. Структура повторяющейся единицы пептидогликана клеточной стенки зубактерий [2]

Углеводы клеточных мембран. Анализ компонентов, из которых состоят клеточные мембраны млекопитающих, указывает, что около 5% приходится на углеводы, входящие в состав гликопротеидов и гликолипидов. Другие гликолипиды, обнаруженные в бактериях и зеленых растениях, содержат глицерин и жирные кислоты, а также α -D-галактозу, глюкозу и маннозу.

ГЛАВА ЧЕТВЕРТАЯ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

В 1869 г. Фридрих Мишер выделил из ядер гнойных клеток (лейкоцитов) вещество кислой природы, которое он сначала назвал *нуклеин*, а позднее (в 1889 г.) – *нуклеиновой кислотой*. В 1891 г. немецкий биохимик Альбрехт Кёссель описал гидролиз нуклеиновой кислоты и установил, что она состоит из остатков фосфорной кислоты, сахара и четырех гетероциклических пуриновых и пиримидиновых оснований. Кёссель впервые указал на существование в клетках двух типов нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты, выделенные из различных биологических объектов, имели сходный химический состав.

Однако биологическая функция нуклеиновых кислот оставалась неизвестной еще в течение почти столетия. Многие исследователи предполагали, что нуклеиновые кислоты имеют какое-то отношение к клеточной наследственности, однако первое прямое доказательство того, что ДНК – это носитель генетической информации, было получено только в 1943 г. в результате открытия, сделанного О.Т. Эвери, К. Маклеодом и М. Маккарти. В 1952 г. А. Тодд установил окончательное строение нуклеозидов, нуклеотидов и роль фосфодиэфирной связи, а Альфред Херши и Марта Чейз в опытах с применением радиоактивных меток получили свидетельство в пользу того, что генетическую информацию несет ДНК [1].

4.1. Общая характеристика строения нуклеиновых кислот

4.1.1. Компоненты нуклеиновых кислот

Все нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры, монмерными звеньями которых являются *нуклеотиды*, и поэтому их еще называют *полинуклеотидами*. Нуклеотиды построены из трех компонентов: гетероциклического *пуринового* или *пиримидинового азотистого основания*, моносахарида *пентозы* (*рибозы* или *дезоксирибозы*) и *фосфорной кислоты*. Среди пуриновых азотистых оснований главную роль играют *аденин (А)* и *гуанин (Г)*, а среди пиримидиновых оснований – *цитозин (Ц)*, *урацил (У)*, *тимин (Т)*:



Урацил
(2,4-дигидропири-
мидин)



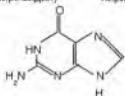
Тимин
(5-метил-2,4-дигидропири-
мидин)



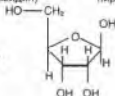
Цитозин
(2-окси-4-аминопири-
мидин)



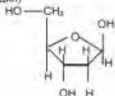
Аденин
(6-аминопурин)



Гуанин
(2-амино-6-окси-
пурин)



D-рибоза
(β -D-рибофураноза)



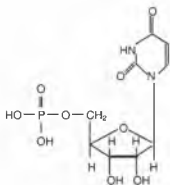
D-2-деоксирибоза
(β -D-деоксирибофураноза)

В составе нуклеиновых кислот азотистые основания связаны только с D-рибозой в РНК или с 2-деокси-D-рибозой в ДНК, образуя соединения, называемые соответственно *рибонуклеозидами* или *деоксирибонуклеозидами*. Ковалентная связь (β -гликозидная, расположенная над плоскостью сахарного кольца) образована первым атомом углерода пентозы с первым атомом азота в пиримидиновых нуклеозидах и девятым атомом азота в пуриновых нуклеозидах.

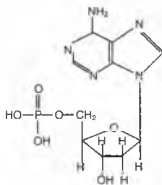
Нуклеозиды, содержащие аденин, называются *аденозином* (или *деоксиаденозином*), содержащие гуанин – *гуанозином* (или *деоксигуанозином*), содержащие урацил – *уридином* (или *деоксиуридином*), содержащие цитозин – *цитидином* (или *деоксицитидином*). Деоксирибопроизводное тимина принято называть тимидином, а рибопроизводное – риботимидином. Перечисленные выше нуклеозиды являются фрагментами структуры нуклеотидов, однако многие нуклеозиды встречаются в свободном состоянии. Например, *пуромидин* (синтезируется *Streptomyces*) является мощным антибиотиком, действующим как ингибитор биосинтеза белков. Некоторые микроорганизмы выделяют *арабинозилцитозин* и *арабинозиладенин* (вместо рибозы в их состав входит β -D-арабиноза), являющиеся мощными антивирусными и антигрибковыми агентами.

Для того, чтобы различить номера атомов азотистых оснований и атомов сахара, к последним в нуклеозидах добавляется сверху штрих. Например, С-3 углеродный атом рибозы в нуклеозиде называется С-3' атомом, а связанный с ним гидроксил – 3'-гидроксилью.

Третий компонент нуклеиновых кислот – ортофосфорная кислота – образует сложноэфирные связи со спиртовыми группами рибозы или дезоксирибозы. Таким образом, нуклеотиды представляют собой *нуклеозидмонофосфаты*:



Уридиловая кислота (УМФ)



Дезоксиадениловая кислота (дАМФ)

Все нуклеотиды представляют собой сильные кислоты, так как остаток фосфорной кислоты легко диссоциирует. К нуклеозидмонофосфату могут присоединиться посредством фосфоангидридной связи еще один или два остатка фосфорной кислоты. При этом образуются нуклеозидди- и нуклеозидтрифосфаты. Если в состав нуклеозида входит дезоксирибоза, то перед названием соответствующего нуклеотида ставится приставка *дезокси-*, например, дАТФ – дезоксиаденозинтрифосфат.

Номенклатура нуклеотидов основана на двух основных подходах. Во-первых, можно рассматривать их как фосфорные эфиры. В этом случае семейство аденозина включает *аденозин-5'-монофосфат*

(АМФ), *аденозин-5'-дифосфат* (АДФ) и *аденозин-5'-трифосфат* (АТФ). Соответствующие производные дезоксирибы называют *дезоксиаденозин-5'-монофосфат* (5'-дАМФ) и т.д. Во-вторых, благодаря наличию кислотной фосфатной группы иногда удобно рассматривать нуклеозидмонофосфаты как кислотные производные исходных нуклеозидов, например адениловая, дезоксиадениловая, уридиловая, тимидиловая кислоты.

Изучение продуктов гидролиза нуклеиновых кислот привело к выводу, что существует два типа полинуклеотидов, которые можно разделить в зависимости от того, какой моносахарид входит в их состав. Нуклеиновая кислота называется *рибонуклеиновой (РНК)*, если в ее состав входит рибоза, или *дезоксирибонуклеиновой (ДНК)*, если в ее состав входит дезоксирибоза.

ДНК и РНК отличаются качественным составом пиримидиновых оснований, содержанием пентозы, наличием и количеством минорных гетероциклических оснований. В состав ДНК входят аденин, гуанин, цитозин, тимин; в РНК вместо тимина присутствует урацил. Кроме главных азотистых оснований, в нуклеиновых кислотах могут присутствовать в небольших количествах необычные – *минорные основания*. Так, в состав ДНК высших организмов входит *5-метилцитозин*, содержание которого у высших растений намного превышает его содержание у животных. В ДНК ряда бактерий встречаются небольшие количества *6-метиладенина* и *5-метилцитозина*. Эти метилированные основания защищают «свои» ДНК от расщепления ферментами – ДНКазами. Особенно много минорных компонентов содержится в транспортных РНК: тиюрацил, дигидроурацил, псевдоуридин, ксантин (2,6-диоксипуридин), гипоксантин (6-оксипуридин), ацетилцитозин, оротовая кислота и другие (табл. 4.1).

Наличие и распределение в ДНК и РНК минорных метилированных оснований обычно связывают с некоторыми важными функциями нуклеиновых кислот: 1) взаимодействием их с белками, в том числе с рядом ферментов; 2) кодированием и передачей информации о биосинтезе макромолекул; 3) участием в механизме памяти и старения организма; 4) регуляцией биосинтеза нуклеиновых кислот и др.

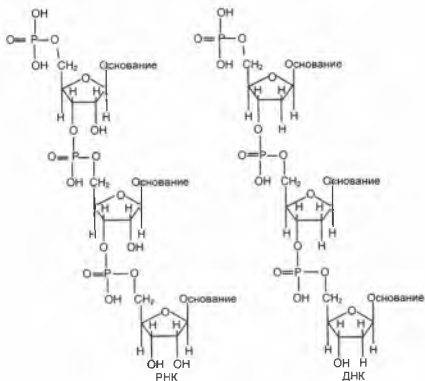
Химический состав нуклеиновых кислот

Химические соединения	ДНК	РНК
Пуриновые основания	Аденин Гуанин	Аденин Гуанин
Пиримидиновые основания	Цитозин Тимин	Цитозин Урацил
Углеводы	Дезоксирибоза	Рибоза
Неорганическое вещество	Фосфорная кислота	Фосфорная кислота
Минорные основания: пуриновые	N_6 -Метиладенин 1-Метилгуанин 3-Метилгуанин 7-Метилгуанин N_2 -Метилгуанин N_2 -Диметилгуанин	N_6 -Метиладенин N_6 -Диметиладенин 1-Метиладенин 2-Метиладенин 2-Метилтио- N_6 -изопентениладенин N_2 -Метилгуанин N_2 -Диметилгуанин 1-Метилгуанин 7-Метилгуанин
пиримидиновые	5-Метилцитозин 5-Оксиметилцитозин Оксиметилурацил Урацил	Ацетилцитозин 5-Метилцитозин 5-Оксиметилцитозин N_4 -Метилцитозин 3-Метилцитозин 3-Метилурацил Тимин 5-Метиламиноэтил-2-тиоурацил Дигидроурацил Псевдоуридин

4.1.2. Структура нуклеиновых кислот

В 1980 г. Ф. Сенгер и У. Гилберт получили Нобелевскую премию за разработку лабораторных методов определения нуклеотидной последовательности ДНК и РНК. Исследования первичной структуры нуклеиновых кислот различных клеток показали, что нуклеотиды

представляют собой повторяющиеся мономерные единицы *олигонуклеотидов* и *полинуклеотидов*. Олигонуклеотиды построены из небольшого количества мономеров (до 20), полинуклеотиды – из многих десятков и сотен. Таким образом, можно говорить о том, что нуклеиновые кислоты – это *полинуклеотиды*, построенные из мономеров. Кроме главных азотистых оснований в нуклеиновых кислотах могут присутствовать в небольших количествах необычные – *минорные основания*, число которых колеблется от нескольких десятков до сотен в зависимости от вида нуклеиновой кислоты (больше их присутствует в РНК). Роль мостика между нуклеотидами выполняет *3',5'-фосфодиэфирная связь*, соединяющая С-3' D-рибозы (или 3'-дезоксирибозы) одного нуклеотида и С-5' другого.



В связи с этим полинуклеотидная цепь имеет определенное направление. На одном ее конце остается свободной 5'-ОН-группа (начало цепи), на другом – 3'-ОН-группа (конец цепи).

Любая полинуклеотидная цепь имеет остов, состоящий из чередующихся групп сахар-фосфат-сахар-... и информационную, или кодирующую часть – последовательность оснований. Именно последовательность азотистых оснований вдоль сахарофосфатной цепи определяет уникальную структуру и функциональную индивидуальность молекул ДНК и РНК. Термины *нуклеотидная последовательность* и *последовательность азотистых оснований* взаимозаменяемы.

Полинуклеотидная цепь, несущая множество фосфатных групп, приобретает отрицательный заряд вследствие того, что эти группы легко диссоциируют. В связи с этим нуклеиновые кислоты в клетке обычно связываются с основными белками, образуя *нуклеопротеины*. РНК с белками формируют *рибонуклеопротеины (РНП)*, ДНК – *дезоксирибонуклеопротеины (ДНП)*.

4.2. Строение ДНК

4.2.1. Первичная структура ДНК

ДНК имеет первичную, вторичную и третичную пространственные структуры. Последовательность чередования нуклеотидов в полинуклеотидной цепи ДНК составляет ее *первичную структуру*. Определение первичной структуры ДНК является очень сложной и трудной задачей, так как молекулы имеют большую молекулярную массу, а нуклеотиды бывают всего четырех видов. Значительных успехов в изучении структуры ДНК достигли Эрвин Чаргафф и сотрудники его лаборатории в Колумбийском университете. В 1950 г. они, используя метод хроматографии, впервые определили нуклеотидный состав ДНК, выделенной из разных объектов, и установили, что соотношение азотистых оснований в ДНК подчиняется универсальным закономерностям. Анализ таких данных позволил Э.Чаргаффу сформулировать несколько основополагающих правил (*правила Чаргаффа*):

1. Сумма пуриновых нуклеотидов (Пур) равна сумме пиримидиновых нуклеотидов (Пир), то есть $\text{Пур}=\text{Пир}$ (или $\text{Пур}/\text{Пир}=1$).
2. Молярное содержание аденина равно молярному содержанию тимина ($A=T$, или $A/T=1$).
3. Молярное содержание гуанина равно молярному содержанию цитозина ($G=C$, или $G/C=1$).
4. Количество аденина и цитозина равно количеству гуанина и тимина ($A+C=G+T$, или $(A+C)/(G+T)=1$).

5. В ДНК из различных источников неодинаково соотношение нуклеотидов: у одних преобладает содержание аденина над гуанином, тимина над цитозином ($A+T > G+C$); у других преобладают гуанин и цитозин над аденином и тиминем ($G+C > A+T$). Таким образом, ДНК из различных источников отличается по нуклеотидному составу, что выражается различной величиной отношения $(G+C)/(A+T)$. В связи с этим Э.Чаргафф выдвинул положение о видовой специфичности ДНК по нуклеотидному составу.

6. Препараты ДНК, выделенные из разных тканей одного и того же вида организма, имеют одинаковый нуклеотидный состав.

Некоторые правила Чаргаффа определяются особенностями вторичной структуры ДНК.

4.2.2. Вторичная структура ДНК

Большинство молекул ДНК (кроме одноцепочечных ДНК некоторых фагов) составлены из двух правозакрученных спиральных цепей, переплетенных друг с другом и противоположно направленных. Кстати, выяснение вторичной структуры ДНК явилось одним из крупнейших открытий в биологии, поскольку при этом одновременно был раскрыт механизм передачи наследственной информации в ряду поколений.

В 1953 г. американский генетик Джеймс Уотсон и английский физик Френсис Крик установили, что ДНК представляет собой *двойную спираль*, состоящую из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей. Подобная структура двойной спирали (дуплекс) стабилизирована межцепочечными водородными связями между специфическими парами азотистых оснований, которые направлены от сахарофосфатного остова каждой цепи внутрь спирали перпендикулярно оси.

Это заключение явилось результатом большого числа экспериментальных данных. К ним относятся работы Э. Чаргаффа и его сотрудников, которые показали, что нуклеотидный состав ДНК жестко сбалансирован. При рентгеноструктурном анализе волокон ДНК Розалин Франклин и Морис Уилкинс в 1953 г. получили характерную дифракционную картину. На основании этой рентгенограммы был сделан вывод о том, что полинуклеотидная цепь ДНК расположена в форме спирали с периодом идентичности (шагом) 3,4 нм и расстоянием между плоскостями оснований 0,34 нм.

Физико-химическими исследованиями было установлено, что в молекуле ДНК между амино- и кетогруппами азотистых оснований

образуются водородные связи. Проблема состояла в том, чтобы построить трехмерную модель молекулы ДНК, которая могла бы объяснить не только наличие этих периодичностей, но также открытые Э.Чаргаффом специфические соотношения оснований ($A=T$ и $G=C$).

В модели двойной спирали Уотсона-Крика две полинуклеотидные цепи обвивают друг друга, образуя *правую спираль* (хеликс), углеводно-фосфатные группы располагаются снаружи, а пуриновые и пиримидиновые основания – внутри. Азотистые основания, принадлежащие двум цепочкам, избирательно соединяются водородными связями, образуя специфические пары: $A-T$, $G-C$ (это отражается в одном из правил Чаргаффа). A и T соединяются двумя водородными связями в положениях 1 с 3 и 6 с 4, G и C – тремя водородными связями в положениях 1 с 3, 2 с 2 и 6 с 4. Эти азотистые основания называются *комплементарными*. Спонтанный процесс образования пар оснований называется *гибридизацией*.

На участках ДНК, богатых $G+C$, две цепи будут удерживаться вместе сильнее, чем на участке, где больше пар $A+T$. Водородные связи – это слабые взаимодействия, но их количество оказывает существенное влияние на конформацию макромолекул ДНК.

Специфичность спаривания азотистых оснований обуславливает *комплементарность*, то есть дополнительность цепей ДНК друг другу. Таким образом, последовательность нуклеотидов в одной цепи автоматически определяет последовательность нуклеотидов в другой, комплементарной цепи.

Расстояния между гликозидными связями одинаковы для каждой пары нуклеотидов – 1,085 нм. Цепи ДНК направлены противоположно друг другу, то есть *антипараллельны*.

Долгое время считалось, что основными силами, обеспечивающими образование и сохранение двуспиральных структур, являются водородные связи, возникающие между цепями. Однако сейчас стало ясно, что стабильность двойной спирали определяется в основном взаимодействием расположенных друг над другом (как стопка монет) азотистых оснований. Расстояние между плоскостями оснований (0,34 нм) примерно эквивалентно сумме вандерваальсовых радиусов ароматических колец. При этом создаются условия для возникновения особого рода вандерваальсовых сил – *стэкинг-взаимодействий*. Существенную роль играют также взаимодействия между ДНК и водой, в результате которых ДНК стремится принять максимально компактную структуру для уменьшения поверхности соприкосновения с водой. При этом гидрофобные основания локализируются внутри спирали, а на ее поверхности образуется гидратируе-

мая углеводно-фосфатная оболочка. Дестабилизирующее воздействие оказывают силы электростатического отталкивания между отрицательно заряженными фосфатами комплементарных цепей.

В 1962 г. за работы, связанные с изучением пространственной вторичной структуры ДНК, Д. Уотсон, Ф. Крик и М. Уилкинс получили Нобелевскую премию.

Следует отметить, что хотя почти всегда ДНК находится в форме двойной спирали, существуют и одноцепочечные ДНК, например, в некоторых вирусах бактерий. В этом случае для обеспечения термодинамической стабильности молекулы образуется сложная скрученная структура. Главное, что и здесь жизненный цикл вируса включает стадию, в которой ДНК бывает в форме двойной спирали, так что основные принципы передачи генетической информации, предусматривающие образование комплементарных пар оснований, остаются в силе.

Конформации двойной спирали ДНК могут быть различными (10 разновидностей). Все возможные формы отличаются друг от друга различным числом оснований на виток и/или углами поворота пар оснований с различной шириной и глубиной двух бороздок. Приведенные ранее параметры двойной спирали ДНК относятся к ДНК *B-формы*. *B-тип* характерен для кристаллической формы ДНК, имеющей определенный процент влажности, влияющий на степень гидратации кристаллов. Кристаллы *B-типа* получаются при высокой влажности. При пониженной влажности получается *A-конформация* ДНК, содержащая 11 пар оснований на один виток спирали. Параметры *A-формы* таковы: плоскости оснований параллельны друг другу, расстояние между плоскостями оснований 0,26 нм, длина одного витка равна 2,86 нм. ДНК способна переходить из *A-формы* в *B-форму* и обратно в зависимости от природы растворителя. Считается, что такие переходы имеют место при взаимодействии ДНК с белком.

Долгое время считалось, что ДНК может быть только правовращающей и левовращающей спираль стереохимически невозможна. Однако в 1979 г. А. Ричем была показана возможность существования левозакрученной ДНК, которая была названа *Z-формой* из-за нерегулярного изгиба сахарофосфатного остова. Необычное свойство левых спиралей состоит в том, что повторяющейся единицей в них является не мононуклеотид, а динуклеотид, поскольку каждые два соседних нуклеотида находятся в различных конформациях. Полагают, что частичный переход правозакрученной формы в левозакрученную может служить регуляторным сигналом, контролирующим экспрессию генов [2].

В целом следует отметить, что вторичная структура ДНК является весьма динамичной и возможность конформационных и иных переходов в ней определяется воздействием агентов окружающей среды. Биспиральные структуры могут возникать в пределах одной и той же цепи. Это происходит в тех случаях, когда в комплементарных цепях ДНК присутствуют *палиндромы* («обратно бегущие» последовательности нуклеотидов). Палиндромы характерны для тех участков ДНК, где расположены зоны узнавания ДНК ферментами и лигандами. Установлено, что благодаря наличию палиндромов спирализуются сами на себя, образуя шпильки, цепи ДНК *E. coli* в зоне лактозного оперона. Палиндромные участки могут способствовать формированию элементов третичной структуры ДНК.

4.2.3. Третичная структура ДНК и организация хроматина в эукариотических клетках

Третичная структура ДНК эукариотических клеток выражена в многократной суперспирализации молекулы, однако, в отличие от прокариот, она реализуется в форме комплексов ДНК с белками. В клетках суперспирализация осуществляется особыми ферментами, которые для бактерий сравнительно хорошо изучены и называются *ДНК-гиразами* (или *топоизомеразами I*). Другие ферменты – *топоизомеразы II* – могут уменьшать число супервитков в кольцевых молекулах, давая набор «изомеров» с различным числом витков.

В эукариотических клетках почти вся ДНК (за исключением ДНК митохондрий и пластид) находится в виде хроматина ядра и хромосом. В хроматине и хромосомах ДНК находится в суперспирализованном состоянии, которое обеспечивается и поддерживается группой особых ядерных основных белков – *гистонов*. Кроме гистоновых белков в хромосомах обнаружены негистоновые белки и небольшое количество РНК.

Простые *гистоновые* белки составляют до 50% хроматина любой клетки. Во всех изученных клетках животных и растений обнаружено пять основных классов гистонов: *H1, H2A, H2B, H3, H4*. Классификация гистонов основана на содержании в них лизина и аргинина (табл. 4.2).

Молекулярная масса и аминокислотный состав основных классов гистоновых белков

Гистон	Молекулярная масса белков	Содержание лизина, %	Содержание аргинина, %
H1	21000	24,8	2,6
H2A	14500	10,9	9,3
H2B	13700	16,0	6,4
H3	15300	9,6	13,3
H4	11300	10,8	13,7

Благодаря своей поликатионной природе (значительный положительный заряд) гистоны как бы специально приспособлены для взаимодействий с полианионным сахарофосфатным остовом двойной спирали ДНК через ионные связи (солевые мостики). Помимо вклада в стабилизацию структуры ДНК имеются данные о возможном участии гистонов в регулировании экспрессии генов ДНК. Молекулярная масса гистоновых белков лежит в пределах от 11 000 до 21 000.

Первичная структура гистонов эволюционно консервативна, у разных животных и растений они мало отличаются. Наиболее консервативны аргининбогатые гистоны H3 и H4. Например, аминокислотные последовательности гистона H4 из проростков гороха и тимуса быка отличаются только двумя из 102 аминокислот.

Негистоновые белки – это общее название всех других белков хроматина разной природы, различных свойств и функций.

ДНК в составе хроматина находится в *B-форме*, хотя имеются данные, что в отдельных участках хроматина существует *Z-форма* ДНК. На ДНК приходится около половины массы хромосом, вторую половину составляют белки.

В 1974 г. Р. Корнбергом было показано, что хроматин состоит из дискретных частиц – *нуклеосом*, соединенных участками свободной ДНК (*спейсерный участок*). Нуклеосома представляет собой нуклеопротеидную частицу, в состав которой входят: 1) нуклеосомное ядро (октамер гистонов: $2H2A+2H2B+2H3+2H4$); 2) участок ДНК (около 200 пар оснований), находящийся в контакте с гистоновым октамером (ядром); 3) линкерная (спейсерная) ДНК (30-80 пар оснований); 4) одна молекула гистона H1, связанного со спейсерным участком ДНК.

Цепочка нуклеосом, напоминающая бусы, образует спиральные структуры, формирующие в итоге хромосому (табл. 4.3).

Таблица 4.3

Различные уровни сверхскрученного состояния ДНК в хромосоме

№ п/п	Вид пространственной структуры	Количество пар оснований	Степень уплотнения ДНК
1	Один оборот спирали в нуклеосоме	80	6-7 раз
2	Соленоид (6-7 нуклеосом на виток)	1200	40-50 раз
3	Петля хроматина	6000	680 раз
4	Хромосома	$1,1 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$ раз

Нуклеосомный уровень организации: ДНК длиной 160-240 пар нуклеотидов, одна молекула гистона H1 и гистоновый октамер. Последний состоит из 8 молекул – по две молекулы из гистонов H2A, H2B, H3 и H4 (рис. 4.1).

В нуклеосоме можно выделить *нуклеосомное ядро* (*нуклеосомный кор*). Эта дискретная частица содержит гистоновый октамер и участок ДНК длиной 145-150 нуклеотидных пар. Нуклеосомный кор выглядит как диск диаметром 11 нм и толщиной 5,7 нм, в котором ДНК образует на поверхности гистонического октамера примерно 1,75 витка левой спирали. Коровая частица содержит полости, заполненные водой. Между коровыми частицами расположены участки ДНК – *линкеры*, их длина варьирует в зависимости от типа клеток. В результате этого варьирует и длина фрагмента ДНК, входящего в состав нуклеосом (от 160 до 240 пар оснований). Межкоровые (линкерные) участки ДНК или свободны, или связаны с гистоном H1 и негистоновыми белками. Гистон H1 способствует компактной упаковке хроматина.

Второй уровень организации хромосом – это образование из нуклеосомной нити более толстых фибрилл (20-35 нм). Предполагают, что фибриллы представляют собой по форме *соленоиды*, образующиеся в результате скручивания нуклеосомной нити. Шаг соленоида равен 11 нм, на один виток приходится около 3-5 нуклеосом. При этом линейные размеры ДНК уменьшаются в 40-50 раз.

Следующий уровень организации хромосом представлен фибриллой толщиной 25-30 нм. При этом нуклеосомная нить образует петли, дополнительно упаковывается, в результате чего происходит уменьшение линейных размеров ДНК примерно в 680 раз. Петлеобразная доменная организация способствует укладке хроматина в ме-

тафазных хромосомах в спиральные структуры более высоких порядков. В результате последовательной упаковки хроматина линейные размеры ДНК уменьшаются примерно в 10^4 раз.



Рис. 4.1. Схематическое изображение вытянутого участка хроматинового волокна, иллюстрирующее строение компактной структуры, образованной нуклеосомами и спейсерными участками ДНК [3]

Таким образом, хроматин является сложной структурой. В зависимости от экспрессии гена меняется степень его упаковки и степень упаковки самой ДНК в хроматине. Термин «экспрессия гена» относится к процессу синтеза белка, контролируемого геном, а также ис-

пользуется в случаях, когда гены кодируют специфические молекулы РНК.

С молекулярной точки зрения ген представляет собой часть огромной молекулы ДНК и содержит закодированную информацию о последовательности аминокислот одной полипептидной цепи. Имеются гены, которые не кодируют белки. Это гены рибосомной и транспортной РНК. Обычный «стандартный» ген представляет собой фрагмент ДНК, расположенный в определенном месте хромосомы.

4.2.4. Цитоплазматическая ДНК

Кроме ДНК, обнаруживаемой в ядре эукариотических клеток, в цитоплазме также присутствует очень небольшое количество ДНК, отличающейся от ядерной по строению и нуклеотидному составу. Эта цитоплазматическая ДНК локализована в митохондриях и хлоропластах фотосинтезирующих клеток. Молекулы ДНК вышеназванных оргanelл просты, невелики и, как правило, замкнуты в кольцо.

Митохондриальные ДНК у растений намного больше, чем у животных. В одной и той же клетке молекулы ДНК хлоропластов значительно больше ДНК митохондрий. Размеры генома хлоропластов у всех исследованных организмов сходны (120-220 тыс. пар нуклеотидов). ДНК митохондрий и пластид кодирует соответствующие тРНК, мРНК и рРНК, а также белки-ферменты, необходимые в процессах репликации, транскрипции и трансляции.

Митохондрии и хлоропласты содержат по несколько копий своей геномной ДНК. Эти молекулы обычно распределены в виде отдельных групп в матриксе митохондрий и в строме хлоропластов, где они прикреплены к внутренней мембране.

В соматических клетках млекопитающих ДНК митохондрий составляет меньше 1% всей клеточной ДНК. В клетках листьев высших растений или в очень крупных яйцах амфибий доля ДНК митохондрий может составлять и 90% (в них осуществляется большинство клеточных процессов синтеза РНК и белков).

4.3. Строение РНК

4.3.1. Рибонуклеиновые кислоты

Все без исключения молекулы РНК в клетке являются одноцепочечными неразветвленными полярными (то есть имеющими различные 5'- и 3'-концы) полимерами, состоящими из четырех видов

нуклеотидов, соединенных друг с другом 5,3'-фосфодиэфирными связями.

Содержащиеся в клетке РНК различаются размером, составом, функциями и локализацией. В цитоплазме любой эукариотической клетки содержатся РНК нескольких видов: *транспортная РНК (тРНК)*, *матричная, или информационная РНК (мРНК, или иРНК)*, *рибосомная РНК (рРНК)*. Функций этих нуклеиновых кислот установлены и хорошо изучены. В ядре обнаруживается *ядерная РНК (яРНК)*, количество которой составляет от 4 до 10% от суммарной клеточной РНК. Основную массу этого вида РНК составляют стабильные виды РНК рибосомной и нерибосомной природы. Особую фракцию яРНК образует гетерогенная ядерная РНК (гяРНК), составляющая 2-10% от общего количества яРНК.

Молекула РНК, как уже отмечалось выше, в отличие от ДНК, состоит из одной полинуклеотидной цепи. Полинуклеотидная цепь РНК может закручиваться на себя, образуя в палиндромных участках короткие двухспиральные выросты («шпильки»), в которых азотистые основания образуют комплементарные пары: Г с Ц (их соединяют три водородные связи) и А с У (между ними образуются две водородные связи).

Некоторые виды РНК могут иметь как первичную, так и вторичную и третичную структуры.

4.3.2. Транспортная РНК

В цитоплазме каждой клетки содержится несколько десятков различных видов молекул тРНК (от одного до шести видов для каждой из 20 стандартных аминокислот). Молекулы тРНК – самые маленькие из всех нуклеиновых кислот (содержат всего примерно по 73-93 нуклеотидов). тРНК составляют 10-20% суммарной РНК клетки и имеют первичную, вторичную и третичную структуры. В митохондриях также имеются особые тРНК, но несколько меньших размеров, чем те, которые обнаруживаются в цитоплазме.

Функции тРНК разнообразны, но основная состоит в том, чтобы транспортировать аминокислоты в рибосомы, то есть принимать непосредственное участие в процессе трансляции. Причем в этом процессе она играет роль *адаптера*, то есть своеобразного переводчика, а именно, переводит последовательность нуклеотидов в последовательность аминокислотных остатков полипептидной молекулы. Каждой из 20 аминокислот соответствует своя тРНК, хотя для некоторых аминокислот известно несколько тРНК. Так, например, суще-

ствуется пять различных тРНК, переносящих лейцин, и пять различных тРНК, переносящих серин. Виды тРНК, способные связывать одну и ту же аминокислоту, называются *изоакцепторными* [4]. Однако каждый вид тРНК переносит в рибосому только один вид аминокислоты, то есть «свою» аминокислоту.

Многие тРНК к настоящему времени выделены в гомогенном виде. В 1965 г. Р. Холли и его сотрудники установили первичную структуру, то есть полную нуклеотидную последовательность аланиновой тРНК (специфичность тРНК обозначается верхним индексом, например тРНК^{Ала}) дрожжей. Эта тРНК содержит 76 нуклеотидных остатков, в том числе 10 модифицированных.

В настоящее время первичная структура расшифрована более чем у 250 тРНК, выделенных из клеток разных организмов: *E.coli*, дрожжей, зародышей пшеницы, печени крысы и кролика и т.д. При сравнении выделенных тРНК удалось выявить много общих черт, характерных для структуры тРНК. В частности, эти исследования показали, что кроме четырех обычных рибонуклеотидов (А, Г, Ц и У) в тРНК содержится много (8-19%) минорных нуклеотидов (около 60 разновидностей: метилированные аденины и гуанины, метилированные пиримидины, например, тимин, 5-метилцитозин и др.). Не все они встречаются в какой-либо одной молекуле тРНК, но универсальными и наиболее распространенными являются *псевдоуридин* и *дигидроуридин*.

Молекула тРНК представляет собой одиночную полинуклеотидную цепь, закрученную «на себя». Она образует сложную пространственную структуру. Если изобразить структурную формулу тРНК в таком виде, чтобы число внутримолекулярных комплементарных пар было максимальным, то такая форма будет иметь вид «клеверного листа». Главный принцип, положенный в ее основу, – образование максимального числа водородных связей между азотистыми основаниями.

«Клеверный лист» многих тРНК содержит спирализованные стебли, заканчивающиеся петлями из неспаренных нуклеотидов. Некоторые молекулы тРНК содержат еще пятую короткую, или *дополнительную ветвь*. Две из этих ветвей (*акцепторная* и *антикодоновая*) непосредственно участвуют в функционировании тРНК в качестве адаптора. Таким образом, вторичная структура тРНК характеризуется частичной спирализацией молекулы.

3'- и 5'-концы полинуклеотидной цепи комплементарно спарены и образуют *акцепторную ветвь* (*акцептирующий стебель*). Это самый длинный спирализованный участок (7 пар нуклеотидов), завер-

шающийся на 3'-конце неспаренной последовательностью ЦЦА. К 3'-или 2'-ОН-группе концевого аденозинового остатка триплета ЦЦА с помощью эфирной связи присоединяется соответствующая аминокислота (через СООН-группу), в результате чего образуется *аминоацил-тРНК*. Аминокислота соединяется со своей тРНК (в соответствии с кодоном мРНК, комплементарным антикодону) с помощью специфического фермента – *аминоацил-тРНК-синтетазы*.

Диаметрально противоположно акцептирующему стеблю располагается *антикодонная ветвь (антикодонный стебель)*. Он насчитывает в длину 5 пар нуклеотидов и несет антикодонную петлю, состоящую из 7 нуклеотидов. Антикодонная петля содержит в своей средней части *антикодон* (специфический триплет нуклеотидов, комплементарный в антипараллельном направлении соответствующему кодону мРНК), который комплементарно взаимодействует с соответствующим кодоном в цепи мРНК. Каждая тРНК имеет свой специфический антикодон.

ТψС-ветвь (или петля псевдоуридина) содержит минорный компонент псевдоуридин. Она состоит из 7 нуклеотидных остатков. Предполагают, что эта петля способствует формированию специфичной для данной тРНК третичной структуры и что именно этой петлей тРНК взаимодействует с рибосомой.

Дигидроуридиловая ветвь несет петлю из 8-12 нуклеотидов, в которой всегда содержится несколько остатков минорного компонента дигидроуридина. Считают, что она участвует во взаимодействии со специфическим активирующим ферментом.

Во многих тРНК находится пятый, *дополнительный стебель (добавочная ветвь, или петля)* разной длины, функции его мало исследованы, вероятнее всего, с его помощью уравнивается длина разных молекул тРНК. На рис. 4.2 представлена обобщенная структура тРНК.

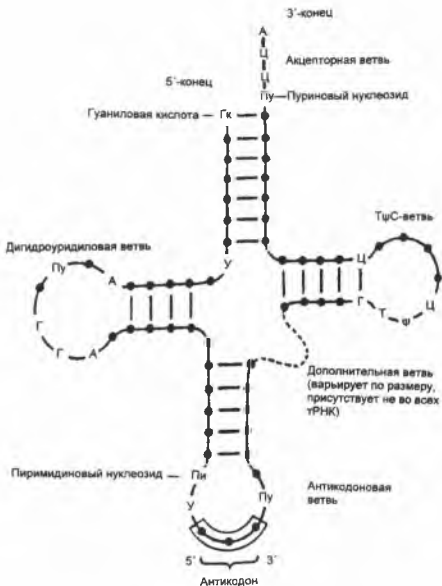


Рис. 4.2. Общая схема строения транспортной РНК [3]

Трехмерная структура тРНК напоминает больше букву Г, нежели клеверный лист. Она очень компактна, так как в дополнение к водородным связям между парами оснований в поддержании третичной структуры тРНК принимают участие и водородные связи другого рода.

Третичная структура тРНК^{Фен}, установленная в 1974 г. с помощью рентгеноструктурного анализа, образуется путем сближения отдельных частей «клеверного листа». Дополнительные водородные связи изгибают «клеверный лист» в Г-образную структуру. При этом антикодон расположен на одном конце, а группа ЦЦА, акцептирующая аминокислоту, – на другом (рис. 4.3).

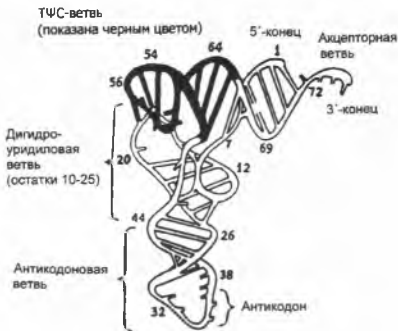


Рис. 4.3. Трехмерная структура дрожжевой фенилаланиновой тРНК, установленная методом рентгеноструктурного анализа [3]

Третичные структуры всех тРНК похожи. Общность пространственного строения разных тРНК дает возможность им взаимодействовать с рибосомами. Незначительные отличия в пространственной структуре молекул тРНК позволяют им взаимодействовать со специфическими ферментами – аминоацил-тРНК-синтетазами.

Сравнение первичной структуры тРНК, выделенных из организмов, стоящих на разных ступенях эволюционного развития, свидетельствует о ее большой консервативности. Структура инициаторных тРНК (приносящих в рибосому первые аминокислоты синтезируемого белка) одинакова у всех позвоночных животных. Можно предположить, что эти тРНК оставались неизменными на протяжении 500 млн. лет, то есть со времени дивергенции позвоночных животных.

4.3.3. Матричная (информационная) РНК

В 1953 г. Ф. Крик высказал предположение, что РНК выполняет функцию переноса генетической информации от ДНК к рибосомам, где происходит синтез белка. В 1961 г. Франсуа Жакоб и Жак Моно предложили название *матричные РНК (мРНК)* для тех молекул клеточных РНК, которые переносят наследственную информацию и служат матрицами для синтеза белков на рибосомах.

Живые клетки способны производить сотни и тысячи различных молекул мРНК. Все они представляют собой одноцепочечные молекулы разной длины. Пока нет данных о наличии у мРНК упорядоченной трехмерной структуры. Все мРНК составляют около 5% от общей массы РНК клетки и имеют общий план строения (наличие «колпачка», или кэпа; 5'-нетранслируемого участка; иницирующего кодона; кодирующей части; кодона терминации, или «бесмысленного» кодона; 3'-нетранслируемого участка; поли-(А)-фрагмента, или поли-(А)-хвоста).

Матричная РНК образуется в процессе транскрипции и несет точную копию генетической информации, закодированной в определенном участке ДНК (гене), а именно информации о последовательности аминокислот в белке [5]. Около 90-95% хромосомы *E.coli* кодируют матричные РНК. У прокариот мРНК образуются сразу в процессе транскрипции и могут кодировать не только одну, но и большее количество полипептидных цепей. Такие виды мРНК называются *полицистронными (полигенными)*. Иначе обстоит дело с мРНК у эукариот. В эукариотических клетках в процессе транскрипции вначале образуются про-мРНК (гетерогенные ядерные РНК). Затем протекает процессинг, в ходе которого первичные транскрипты превращаются в нативную, зрелую мРНК. У эукариот зрелые мРНК являются *моноцистронными (моногенными)*, то есть они несут информацию только об одном белке.

Матричные РНК получили свое название в связи с той функцией, которую они выполняют в клетке, то есть они служат матрицами, на

которых синтезируются полипептидные цепи на рибосомах. Каждой аминокислоте соответствует в мРНК определенная последовательность трех нуклеотидов (*триплет*), называемая *кодоном* этой аминокислоты. Последовательность кодонов в цепи мРНК определяет последовательность аминокислот в белке. Поскольку мРНК несет наследственную информацию о первичной структуре белка, нередко ее называют *информационной РНК (иРНК)*.

мРНК обладает сложной вторичной структурой, которая необходима для считывания знаков начала (*инициации*) и окончания (*терминации*) синтеза белка. Существуют данные, что мРНК может образовывать несколько двухспиральных «шпилек», на концах которых располагаются знаки инициации и терминации.

4.3.4. Рибосомная РНК

Рибосомная РНК является той основой, на которой располагаются белки, образуя *рибосому*. Размеры молекул рибосомных РНК несколько отличаются у животных и растений. У всех организмов обнаруживается три вида рРНК, различающихся по молекулярным массам и локализации в рибосомах [6]. Два вида рРНК являются высокомолекулярными, а третий – низкомолекулярным. В рибосомах эукариот присутствует еще одна низкомолекулярная рРНК.

Рибосомные РНК вместе с белками формируют *большую* и *малую субчастицы рибосом*, которые различаются константами седиментации и молекулярными массами. Большая и малая субчастицы формируют нативную рибосому. Рибосомы можно разделить на классы в зависимости от скорости седиментации (оседания) при ультрацентрифугировании. Поскольку скорость седиментации выражается в единицах Сведберга (Svedberg), или S, то рибосомы делят на следующие два класса: 70S и 80S.

Малая молекула рРНК локализована в малой частице рибосомы (30-40S), а большая – в большой субчастице (50-60S). Во всех без исключения рибосомах присутствует низкомолекулярная рРНК (5S), которая локализована в 50-60S субчастицах рибосом. Низкомолекулярная рРНК с константой седиментации 5,8S обнаружена только в эукариотических рибосомах.

Рибосомы животных содержат 28S и 18S рРНК. 28S рРНК животных варьирует по величине у разных видов в зависимости от их положения в эволюционном ряду, ее молекулярная масса колеблется от 1,4 млн. у морских ежей до 1,75 млн. у млекопитающих.

Рибосомы растений содержат 25S, 18S, иногда 16S рРНК. 5S рРНК прокариот гомологичны 5,8S рРНК эукариотических клеток. Прокариотические рибосомы содержат приблизительно 65% рРНК и около 35% белка.

Вторичная структура рРНК характеризуется спирализацией коротких участков полинуклеотидной цепи самих на себя, в результате чего вся молекула принимает V-образную или Y-образную форму. Такие молекулы рРНК формируют каркас, к которому прикрепляются белки, создавая плотно упакованные рибонуклеопротеины. Около 2/3 рРНК организована в шпильки, остальная часть молекулы представлена одноцепочечными «аморфными» участками, где сосредоточены пуриновые основания. Именно с «аморфными» участками в основном и связаны белки рибосом.

Молекулярные массы рибосомных белков варьируют от 5000-7000 до 50 000-70 000. Набор белков в субъединицах различен. Каждый белок рибосомы уникален, то есть представлен одной молекулой [7].

Белки рибосом, подобно гистонам, обладают основным характером. Митохондриальные рибосомы, выделенные из разных источников, отличаются и по количественному, и по качественному составу рибосомных белков. Митохондриальные рРНК не гомологичны ни цитоплазматическим рРНК, ни рРНК прокариот. Они отличаются как по первичной, так и по вторичной структурам. Их структура менее стабильная, меньше содержит спиральных участков. Крупные рРНК митохондрий и хлоропластов близки к таковым прокариот. 5,8S РНК не обнаружена в рибосомах ни у митохондрий, ни у хлоропластов. В большинстве рибосом митохондрий не обнаружена 5S РНК, но она присутствует в хлоропластах.

В процессе синтеза белка от 3 до 100 рибосом взаимодействуют с одноцепочечной молекулой мРНК, образуя *полисомы (полирибосомы)*. Образование групп рибосом повышает эффективность использования мРНК, поскольку на ней может одновременно синтезироваться несколько идентичных полипептидных цепей.

ГЛАВА ПЯТАЯ

ЛИПИДЫ

5.1. Классификация липидов

По химическому строению липиды весьма разнообразны. В их состав могут входить жирные кислоты, спирты, азотистые основания, фосфорная кислота, углеводы, аминокислоты и т.д. Но все эти соединения объединяет одно общее свойство – они *неполярны* и полностью (или почти полностью) нерастворимы в воде, но растворимы в неполярных растворителях (хлороформе, сероуглероде, эфире, горячем этаноле и пр.), то есть они являются *гидрофобными* соединениями.

Существует несколько классификаций липидов: по *составу*, по *строению*, по *функциям*. Наиболее общая классификация основывается на *химическом составе* липидов: 1) *простые липиды* (представлены в основном эфирами высших жирных кислот и спиртов – *жиры, воски*); 2) *сложные липиды* (помимо жирных кислот и спиртов в их состав входят и другие компоненты, которые соединены химическими связями различного типа – *фосфоацилглицерины, сфингомиелины, гликолипиды*); 3) *производные липидов* (все соединения, которые нельзя однозначно отнести к простым или сложным липидам – *стероиды, каротиноиды, витамины липидной природы*).

Структурное многообразие липидов в основном обусловлено наличием в их составе различных жирных кислот.

Жирные кислоты – это *карбоновые кислоты с длинной алифатической цепью*. В настоящее время известно более 250 жирных кислот, отличающихся по степени и характеру разветвления углеродной цепи, числу и положению двойных связей, природе и количеству других функциональных групп, по длине углеродной цепи. Для удобства среди наиболее часто встречающихся в природе жирных кислот выделяют две основные группы: 1) *монокарбоновые кислоты*, содержащие линейные углеводородные цепи с четным числом атомов (обычно C_{12} - C_{20}), они составляют преимущественную часть природных липидов. Значительно реже встречаются кислоты с более короткими цепями или с нечетным числом углеродных атомов; 2) часто встречаются кислоты, содержащие *этиленовые (ненасыщенные, двойные)* связи, обычно это C_{16} - и C_{20} -кислоты. В ненасыщенных кислотах с двойными связями почти всегда реализуется *цис*-конфигурация, которая приводит к сильному изгибу алифатической цепи.

В большинстве клеток жирные кислоты встречаются не в свободном состоянии, а в ковалентно связанной форме в составе липидов различных классов.

В природных липидах обнаруживаются разнообразные жирные кислоты, различающиеся длиной цепи, наличием, числом и положением двойных связей (табл. 5.1). Некоторые жирные кислоты содержат также боковые метильные группы.

Таблица 5.1

Наиболее часто встречающиеся природные жирные кислоты

Кодовое обозначение	Структура	Тривиальное название	Температура плавления, °C
Насыщенные жирные кислоты			
C ₁₂	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COOH	Лауриновая	44,2
C ₁₄	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COOH	Миристиновая	53,9
C ₁₆	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH	Пальмитиновая	63,1
C ₁₈	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH	Стеариновая	69,6
C ₂₀	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COOH	Арахидиновая	76,5
C ₂₄	CH ₃ (CH ₂) ₂₂ COOH	Лигноцериновая	86,0
Ненасыщенные жирные кислоты			
C _{16:1}	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Пальмитолеиновая	-0,5
C _{18:1}	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Олеиновая	13,4
C _{18:2}	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Линолевая	-5
C _{18:3}	CH ₃ CH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Линоленовая	-11
C _{20:4}	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CHCH ₂ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH	Арахидоновая	-49,5

Жирные кислоты, входящие в состав липидов высших растений и животных, как правило, имеют четное число углеродных атомов, причем преобладающими являются кислоты с 16-20 атомами углерода в молекуле. Длинная углеводородная цепь, составляющая хвост молекулы, может быть полностью насыщена или ненасыщена. Как правило, ненасыщенные жирные кислоты встречаются и у животных, и у растений в два раза чаще, чем насыщенные. При температуре тела насыщенные жирные кислоты ряда от C₁₂ до C₂₄ находятся в твердом

восподобном состоянии, а ненасыщенные жирные кислоты представляют собой жидкости.

Наиболее часто в природных жирах встречается *олеиновая кислота* (в большинстве жиров ее более 30%) и *пальмитиновая кислота* (от 15 до 50% в большинстве исследуемых жиров). Пальмитиновая кислота служит исходным материалом для биосинтеза других очень важных для организмов кислот – стеариновой, лауриновой, миристиновой и др. Остальные жирные кислоты присутствуют в природных жирах, как правило, в небольших количествах (несколько процентов). *Масляная* и *капроновая* кислоты хорошо представлены в некоторых жирах животного происхождения, а *каприловая* и *каприновая* кислоты – в кокосовом масле. *Лауриновой* кислоты много в лавровом масле, *миристиновой* – в масле мускатного ореха, *арахиновой*, *бегоновой* и *лигноцериновой* – в арахисовом и соевом маслах. Арахидоновая кислота является предшественником в биосинтезе простагландинов и лейкотриенов. Полиненасыщенные жирные кислоты – *линолевая*, *линоленовая* – составляют основу льняного, конопляного, подсолнечного, хлопкового масел. Эти две жирные кислоты не синтезируются в организме высших животных и человека и поступают с пищей (*незаменимые жирные кислоты*). *Стеариновая* кислота содержится в значительном количестве (25% и более) в некоторых твердых животных жирах (жир баранов и быков) и маслах тропических растений (кокосовое масло) [1, 2].

В организме человека могут образовываться тиоэфиры жирных кислот в АТФ-зависимой реакции, катализируемой ферментом *тиокиназой*. Обычно сульфгидрильная группа обеспечивается соединением, называемым *коферментом А (CoA-SH)*. Ацилтиоэфирная связь (—CO—S—) имеет важное биологическое значение и часто встречается в составе различных соединений.



В организме животных и человека окисление жирных кислот катализируется специфическими ферментами. Субстратами этих ферментов являются жирные кислоты с длинной цепью (например, арахидоновая кислота, являющаяся предшественником в биосинтезе *простагландинов*). Простагландины присутствуют в большинстве

тканей млекопитающих, но в очень маленьких концентрациях ($\leq 10^{-9}$ г). Простагландины (называемые *первичными простагландинами*, или *простагландинами E*) регулируют многие процессы в клетке (сокращение гладких мышц, кровяное давление, передачу нервных импульсов, воспалительный процесс, водный баланс, электролитный баланс, свертывание крови и т.д.). Кроме них, существуют *вторичные простагландины* – продукты ферментативного превращения простагландинов E. К их числу относятся важные регуляторные агенты – *эндопероксиды* и *тромбоксаны* [3, 4].

Из арахидоновой кислоты в организме человека могут образовываться такие соединения, как *лейкотриены*. Эти соединения являются мощными активаторами сокращения гладких мышц. Особенно чувствительны к действию подобных соединений (пептидолейкотриенов) мелкие бронхиолы. Ревматоидные артриты, псориаз, некоторые болевые и температурные реакции, регуляция сокращения матки во время родов, регуляция цикла сна также обусловлены активностью лейкотриенов.

Простые липиды можно разделить на 2 группы: 1) нейтральные ацилглицерины и 2) воски.

Ацилглицерин – это эфир трехатомного спирта, глицерина и жирной кислоты (или нескольких кислот). В зависимости от числа этерифицированных гидроксильных групп различают моно-, ди- и триацилглицерины. В природе наиболее часто встречаются триацильные производные (рис. 5.1).

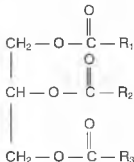


Рис. 5.1. Общая схема строения триацилглицеролов:
 R_1 , R_2 и R_3 – углеводородные хвосты трех жирных кислот

Во всех случаях простой ацилглицерин не содержит функциональных ионных групп и относится к *нейтральным липидам*. Ацильные боковые цепи R алифатических жирных кислот обычно различны (*смешанные триацилглицеролы*). Реже, но все же встречаются в биологических объектах триацилглицеролы, содержащие в своем составе три одинаковые жирные кислоты (*простые триацилглицеролы*).

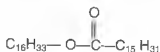
В зависимости от физического состояния при комнатной температуре триацилглицеролы называют *нейтральными жирами* (твердые) и *нейтральными маслами* (жидкие). Твердая или жидкая консистенция жиров определяется преобладающим содержанием в них насыщенных или ненасыщенных жирных кислот. Так, триглицериды жидкого при обычных условиях подсолнечного масла ($t_{\text{тн}} = -21^{\circ}\text{C}$) включают 39% олеиновой и 46% линолевой кислоты. Твердое растительное масло бобов какао ($t_{\text{тн}} = 30-34^{\circ}\text{C}$) имеет в своем составе 35% пальмитиновой и 40% стеариновой кислот. Бараний жир, например, имеет температуру плавления примерно на 10°C выше, чем свиной, потому что в нем содержится на несколько процентов меньше пальмитидолеина (46 и 53% соответственно) и больше олеодипальмитина (13 и 5% соответственно).

В большинстве растительных и животных клеток триацилглицеролы находятся в цитозоле в виде эмульгированных маслянистых капелек. В специализированных клетках соединительной ткани животных (*адипоцитах*, или *жировых клетках*) огромное количество триацилглицеролов может запасаться в виде жировых капелек, заполняющих почти весь объем клетки. Большое количество адипоцитов обнаруживается под кожей, в брюшной полости и в молочных железах. Триацилглицеролы значительно лучше, чем гликоген, приспособлены для запасаания энергии: во-первых, они могут накапливаться в очень больших количествах в практически чистом, негидратированном виде, а во-вторых, в расчете на единицу веса в них запасается в два раза больше энергии, чем в углеводах (при распаде 1 г жира до CO_2 и H_2O выделяется 38,9 кДж энергии, а при распаде 1 г углеводов – всего 16,1 кДж) [5].

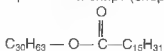
В животных тканях триацилглицерины выполняют 3 основные функции: 1) в жировой ткани они образуют так называемые жировые отложения, представляющие собой форму *запасаания энергии и углерода*; 2) в виде липопротеиновых частиц (*хиломикрон*ов), усвоенные организмом жирные кислоты в виде триацилглицеринов *переносятся* по лимфатической системе и кровяному руслу, распределяясь в организме животного; 3) триацилглицерины выполняют роль *физической защиты* и *термоизолятора* различных органов тела.

У верблюдов запасы триацилглицеролов служат источником эндогенной воды.

Воски – это сложные эфиры, однако входящие в их состав и спирт (с числом углеродных атомов от 16 до 22), и кислота (с числом углеродных атомов от 14 до 36) являются достаточно длинными молекулами, например:



Цетиловый спирт (спермацет)



Мирициловый спирт (пчелиный воск)

Все воски абсолютно нерастворимы в воде. В составе восков найдены несколько десятков высших жирных кислот: пальмитиновая (пчелиный воск, спермацет); лигноцериновая (воск пальмы); церотиновая, монтановая, мелиссиновая и лацериновая обнаружены в пчелином воске, воске листьев и фруктов. Как в свободном состоянии, так и в виде сложных эфиров в восках обнаружены такие спирты, как цетиловый (спермацет), цериловый (пчелиный воск), монтановый и мирициловый спирты – в пчелином воске, воске листьев и фруктов.

Природные воски обычно являются конечными продуктами метаболических путей, основная роль которых сводится к образованию защитного слоя. Так, у позвоночных секретиремые кожными железами воска выполняют функцию защитного покрытия, смазывающего и смягчающего кожу и предохраняющего ее от воды. Восковым секретом покрыты также волосы, шерсть и мех. У птиц, особенно водоплавающих, выделяемые копчиковой железой воска придают перьевому покрову водоотталкивающие свойства.

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

Восковое покрытие листьев, стеблей и плодов многих растений предохраняет эти органы растений от смачивания водой, проникновения микроорганизмов и уменьшает потерю влаги. Блеск листьев многих тропических растений обусловлен отражением света от воскового покрытия.

Воски более устойчивы к действию света, окислителей, нагреванию и другим физическим и химическим воздействиям, а также хуже гидролизуются, чем жиры. Известны случаи, когда пчелиный воск сохранялся тысячелетиями. Именно поэтому воски выполняют в организме защитные функции.

Существует три основных класса *сложных липидов*: 1) *фосфоацилглицерины*, 2) *сфингофосфолипиды* и 3) *гликолипиды*. Соединения, относящиеся к 1 и 2 группам, называют также *фосфолипидами* или *фосфатидами* из-за наличия в их молекулах фосфатидных групп. По своему строению фосфолипиды представляют собой эфиры фосфорной кислоты и двух многоатомных спиртов – глицерина и сфингозина. Фосфоглицериды содержат группировки двух разных типов, а именно полярные гидрофильные «головы» и неполярные гидрофобные «хвосты». Вследствие этого фосфоглицериды обладают *амфипатическими* свойствами. Благодаря такому свойству фосфоацилглицерины являются обязательными компонентами большинства мембран животных, растительных и бактериальных клеток. Число различных фосфолипидов и их относительные концентрации сильно варьируют в зависимости от типа клеток и их физиологического состояния.

В живых организмах встречается несколько основных видов фосфолипидов: *фосфатидилхолин (лецитин)*, *фосфатидилэтаноламин (кефалин)*, *фосфатидилглицерин*, *фосфатидилсерин*, *фосфатидилинозит*, *дифосфатидилглицерин (кардиолипин)* и *фосфатидная кислота*. Из фосфатидной кислоты (рис. 5.2) образуются все остальные фосфолипиды.

В структурном отношении фосфатидная кислота представляет собой простейший фосфоацилглицерин. Различные фосфоацилглицерины отличаются друг от друга дополнительными группировками, присоединенными фосфозфирной связью к фосфатидной кислоте. Два неполярных хвоста фосфолипидов представлены, как правило, жирными кислотами, содержащими 16 или 18 углеродных атомов.

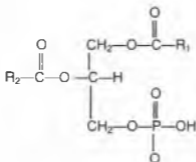
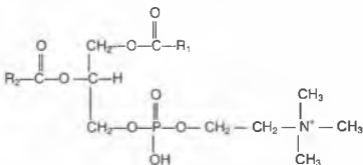


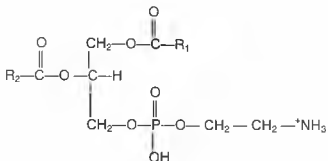
Рис. 5.2. Структура L- фосфатидной кислоты. R₁ и R₂ - остатки жирных кислот, этерифицирующих первую и вторую гидроксильные группы глицерола. Третья гидроксильная группа глицерола этерифицирована фосфорной кислотой

Если через остаток фосфорной кислоты к фосфатидной кислоте присоединяется какое-либо полярное гидрофильное соединение (спирты – этаноламин, холин, инозитол или аминокислота серин), то возникают различные классы амфипатических соединений, составляющих основу липидного бислоя мембран. Названия различных типов фосфоглицеридов образуются в соответствии с названием вещества в их полярной группе:

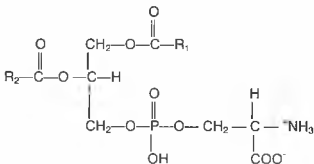
1) *фосфатидилхолин*



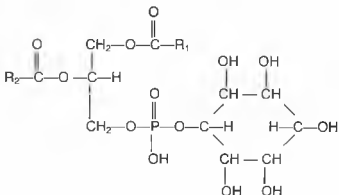
2) фосфатидилэтаноламин



3) фосфатидилсерин



4) фосфатидилинозит



Одним из важнейших представителей глицерофосфолипидов является *фосфатидилхолин (лецитин)*. Он очень широко распространен в тканях высших животных и растений, где его содержание достигает 60% от общего количества фосфолипидов. Благодаря присутствию сильно основной холиновой группы и кислотной фосфатной группы лецитин представляет собой цвиттерийон в широком диапазоне pH. В качестве гидрофобных цепей в фосфатидилхолине присутствуют остатки насыщенных и ненасыщенных жирных кислот с 16-22 углеродными атомами (преобладающими являются C_{18} - и C_{18} -кислоты).

К важнейшим фосфолипидным компонентам клеточных мембран, наряду с фосфатидилхолином, относится также *фосфатидилэтаноламин (кефалин)*. Он содержится в тканях животных и растений в несколько меньших количествах – 20-30% и, в отличие от лецитина, является одним из основных компонентов бактериальных мембран.

В состав кефалина животного происхождения обычно входят жирные кислоты той же длины, что и в фосфатидилхолине. Бактериальный фосфатидилэтаноламин характеризуется высоким содержанием насыщенных и разветвленных жирных кислот и поэтому более устойчив. 1-Алкильные и 1-алкенильные формы кефалина также широко распространены в природе и содержатся, например, в головном и костном мозге, сердечной мышце, тканях моллюсков и других морских организмов, а также в некоторых простейших.

Среди природных фосфолипидов, содержащих в качестве структурного компонента аминокислоты, наиболее распространенным является *фосфатидилсерин*. Наличие двух кислотных и одной основной групп в молекуле фосфатидилсерина придает ему кислые свойства. Его содержание в биологических мембранах составляет от 5 до 15%. И хотя фосфатидилсерин входит в состав практически всех про- и эукариотических клеток, однако, как правило, он является минорным мембранным компонентом. Больше всего фосфатидилсерина в мозге млекопитающих (около 15%), а в тканях других органов (сердце, почки, печень, селезенка, легкие) его количество не превышает 10%.

Являясь регулятором активности целого ряда мембраносвязанных ферментов, фосфатидилсерин играет очень важную роль в метаболизме клеток. Кроме того, во многих клетках из фосфатидилсерина может под действием мембранного фермента фосфатидилсеринкарбоксилазы синтезироваться другой фосфолипид – фосфатидилэтаноламин.

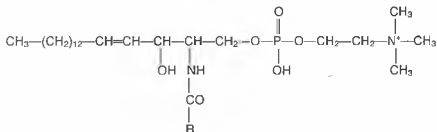
Фосфатидилинозит является представителем группы кислых глицерофосфолипидов (наряду с фосфатидилинозитфосфатом и фосфатидилинозитдифосфатом). Все фосфоинозитиды содержат в составе полярной группы один и тот же циклитол – миоинозит, гидроксигруппа которого при атоме С-1 соединена с остатком фосфатидной кислоты [6].

Фосфатидилинозит присутствует почти во всех животных тканях (но в минорных количествах – 5-10%), многих растительных тканях и в некоторых микроорганизмах. Больше всего полифосфоинозитидов содержится в нервных тканях. В мозге млекопитающих они составляют около 1/2 фракции инозитсодержащих фосфолипидов. Очень много полифосфоинозитидов в синапсоммах и миелиновой оболочке нервных клеток.

В организме фосфолипиды гидролизуются ферментативным путем – под действием различных *фосфолипаз*. В яде кобры содержится *фосфолипаза А₂*, которая гидролизует эти липиды с образованием продуктов (например, лизофосфотидилхолина, лизофосфотидилэтанолamina), обладающих гемолитическим действием.

Дифосфатидилглицерин (кардиолипин) представляет собой производное фосфатидной кислоты, у которого в состав полярной группы входит еще один остаток глицерина. Гидроксильные группы двух внешних остатков глицерола эстерифицированы жирными кислотами. Дифосфатидилглицерин – один из наиболее распространенных фосфолипидов бактерий (около 70% от общего количества фосфолипидов). В растительных тканях содержится достаточно много кардиолипина: например, в хлоропластах его содержание колеблется от 40 до 60%. В животных тканях он присутствует в минорных количествах (не более 5-10%), причем основное его количество сосредоточено во внутренней мембране митохондрий.

В результате полного гидролиза *фосфосфинголипидов* образуются: одна молекула жирной кислоты, холин, фосфорная кислота и сфингозин. Глицерина эти соединения не содержат:



Сфингозины представляют собой семейство *аминоспиртов с длинной ненасыщенной цепью*, различающихся длиной цепи. Несмотря на наличие двух ОН-групп, остаток жирной кислоты присоединен к единственной NH₂-группе сфингозина амидной связью. Такое соединение называется *церамидом*. Присоединение фосфорилхолинового остатка к церамиду завершает образование структуры *сфингомиелина*. Он содержится в мембранах растительных и животных клеток (4-10% от общего количества фосфолипидов). Особенно его много в нервной ткани, в печени и почках.

Сфингомиелины, обладающие отчетливым амфипатическим свойством (то есть имеют и гидрофильные, и гидрофобные группы), присутствуют в большинстве мембран животных клеток, особенно много их в *миелиновых оболочках* нервных клеток.

Для сфингомиелинов характерна органная и видовая специфичность. Кроме того, установлено, что органная специфичность сфинголипидов зависит от качественного состава высших жирных кислот: например, для сфинголипидов мозга характерно присутствие нервной и лигноцериновой кислот. Некоторые патологические состояния организма связаны с изменением содержания сфингомиелина. Так, например, увеличение содержания этого липида в стенках аорты отмечено при атеросклерозе.

Еще одну группу сложных липидов образуют *гликолипиды* (гликозилированные сфинголипиды). Это очень разнообразная группа липидов, у которых гидрофильная полярная «голова», состоящая из одного или нескольких углеводных остатков (как правило, глюкозы, галактозы, галактозилсульфата, галактозамина, глюкозамина, N-ацетилнейраминовой кислоты), соединена гликозидной связью с гидрофобной частью липидной молекулы. Гликолипиды играют существенную роль в функционировании биологических мембран. Они содержатся преимущественно в ткани мозга, но имеются также в клетках крови и других тканей.

Глицерогликолипиды представлены в природе в основном *гликозилдиацилглицеринами*, у которых моно-, ди- и трисахариды связаны гликозидной связью с гидроксильной группой диацилглицеринов.

В гликоксфинголипидах углеводсодержащая гидрофильная полярная «голова» соединена гликозидной связью с концевой гидроксиметильной группой церамида, и образующиеся соединения рассматриваются как *гликозилцерамиды*. Такие липиды встречаются в мозге, селезенке, эритроцитах, почках и печени, где они локализируются преимущественно в плазматических мембранах.

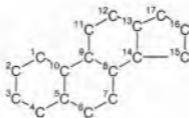
Простейшим типом гликоэфинголипидов являются моногексозил-церамиды, называемые *цереброзидами* (наиболее распространенными представителями этого класса являются галакто- и глюкоцереброзиды). Цереброзиды находятся в мембранах центральной нервной системы и участвуют в изоляции нейрона.

Другая группа гликоэфинголипидов – это *ганглиозиды*. Они содержат один или несколько остатков сиаловых кислот в олигосахаридной цепи. Кроме сиаловых кислот, в состав ганглиозидов входят жирные кислоты (преимущественно насыщенные с 16-22 углеродными атомами), сфингозиновые основания (чаще всего C₁₈- и C₂₀-сфингозины), гексозы (глюкоза и галактоза) и гексозамины (обычно N-ацетилгалактозамин). Олигосахаридная цепь ганглиозидов может содержать от 2 до 10 и более углеводных остатков.

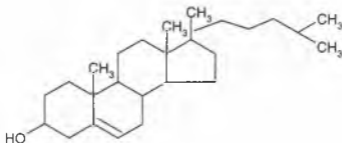
Ганглиозиды являются специфическими детерминантами межклеточного взаимодействия, так как они играют важную роль в росте и дифференцировке ткани. Они являются маркерами трансформации нормальных клеток в раковые, обеспечивают компактизацию бластомеров во время дробления яйца, взаимодействуют с белковыми токсинами, участвуют в процессах рецепции гормонов, факторов роста, лейкинов, являются иммуномодуляторами и вторичными посредниками. Нарушение обмена гликозидов может привести к ауто-сомно-рецессивному заболеванию – ганглиозидозу.

Производные липидов представляют собой весьма гетерогенную группу. Их сходство ограничивается лишь плохой растворимостью в воде. Наиболее важными и хорошо изученными в структурном и функциональном плане являются *стероиды*.

Стероиды обнаружены во всех организмах, где выполняют различные функции. В организме человека они, например, играют роль половых гормонов, эмульгирующих агентов при переваривании липидов, участвуют в транспорте липидов через мембраны в плазме крови, выступают как противовоспалительные агенты и в качестве регуляторов некоторых метаболических процессов. Все стероиды обладают сходной структурой, в основе которой лежит конденсированная система *циклопентанпергидрофенантрена*:



Разнообразие структур стероидов определяется разной степенью ненасыщенности и наличием нескольких группировок в разных положениях циклов. В организме человека наибольшее значение имеют *стерины*, наиболее важным представителем которых является *холестерин (холестерол)*:



Холестерол содержит спиртовую группу при C_3 и разветвленную алифатическую цепь при C_{17} . Гидроксильная группа может быть эстерифицирована высшей жирной кислотой. При этом образуются эфиры холестерина – *холестериды*. Другие эфиры стерина называются *стериды*. У человека примерно 10% стероидов представлены в виде стерина, а большая часть – в виде стеридов.

Холестерол играет ключевую роль как промежуточный продукт в синтезе многих других соединений. Холестерин входит как структурный компонент в клеточные мембраны, однако его концентрация варьирует (0-40% суммарного содержания липидов мембраны). Холестерол является первичным метаболическим предшественником других важных стероидов (желчных кислот, половых гормонов, предшественником витамина D).

Холевые кислоты – важнейшие ингредиенты желчи, обеспечивающие нормальный ход всасывания жирных кислот в кишечнике человека и животных. *Эстрадиол* и *тестостерон* – соответственно

женский и мужской половые гормоны, оказывающие огромное влияние на процессы жизнедеятельности.

Из высших жирных кислот в составе стеридов обнаружены в основном *пальмитиновая*, *стеариновая* и *олеиновая* кислоты. Однако в стероидах, представляющих, например, главную составную часть *ланолина* (фракция жира овечьей шерсти), найдены *миристиновая*, *арахидоновая* и *церотиновая* кислоты, а также специфические высшие жирные кислоты с разветвленной углеродной цепью – *ланопальмитиновая*, *ланостеариновая* и др.

В растениях холестерол отсутствует. У них есть другие стерины, известные под названием *фитостерины* (например, *стигмастерин*). В грибах обнаружены *эргостерины*.

5.2. Роль липидов в питании

Липиды играют огромную роль в процессе питания человека. Так, липиды являются обязательной составной частью сбалансированного пищевого рациона человека. При сбалансированном питании соотношение белков, липидов и углеводов должно составлять 1:1:4. В среднем организм взрослого человека потребляет 80 г животных и растительных жиров в сутки. В пожилом возрасте и при отсутствии физической нагрузки потребность в жирах снижается, при тяжелой физической работе – увеличивается.

Значение жиров как пищевого продукта многообразно. Прежде всего, жиры обеспечивают потребности организма в энергии, являясь высококалорийным продуктом. Так, 1 г жиров при окислении в организме дает 38,9 кДж (9,3 ккал), а 1 г белков или углеводов – 17,2 кДж (4,1 ккал).

Жиры являются растворителями витаминов А, Д, Е. В связи с этим обеспечение организма этими витаминами зависит от поступления жиров. С жирами поступают незаменимые жирные полиненасыщенные кислоты (*линолевая*, *линоленовая*, *арахидоновая*), условно объединенные в группу под названием «витамин F», фосфолипиды, стерины и другие вещества.

Избыток различных веществ (белков, углеводов), поступающих в организм человека с пищей, так или иначе в ходе метаболизма превращается в триацилглицеролы и складывается в таком виде в очень больших количествах (до ста и более килограммов).

ГЛАВА ШЕСТАЯ

ГОРМОНЫ

6.1. Общая характеристика гормонов

Слово «гормон» происходит от греческого *hormao* и означает «возбуждать», «раздражать». Гормон – это вещество, которое выделяется тканью одного типа, как правило, в следовых количествах и доставляется кровью в другую ткань (ткань-мишень). Там гормон вызывает специфическую биохимическую или физиологическую реакции. Наука о гормонах называется эндокринологией [1].

Гормоны регулируют обмен веществ и другие функции организма: ритм сердца, давление крови, работу почек, перистальтику кишечника, выделение пищеварительных ферментов, рост клеток и тканей, работу репродуктивной системы.

6.1.1. Классификация гормонов

Существует три класса гормонов: пептидные, производные аминокислот и стероидные. Часто первые два класса объединяют в группу азотсодержащих гормонов. Некоторые авторы делят пептидные гормоны на низкомолекулярные пептиды и белки.

Пептидные гормоны могут содержать от 3 до 200 аминокислотных остатков. К ним относятся все гормоны гипоталамуса, гипофиза, парашитовидной железы, а также инсулин и глюкагон, секретируемые поджелудочной железой, и кальцитонин щитовидной железы. В качестве примера на рис. 6.1 представлен пептидный гормон тиролиберин.

Гормоны, принадлежащие к аминам, представляют собой низкомолекулярные водорастворимые соединения, содержащие в своем составе аминокислоты (рис. 6.1). К их числу относятся адреналин, секретируемый мозговой тканью надпочечника, и тиреоидные гормоны (тироксин, трийодтиронин).

К стероидным гормонам (которые хорошо растворимы в жирах) относятся гормоны коры надпочечников (рис. 6.2), андрогены (мужские половые гормоны) и эстрогены (женские половые гормоны). В основе структуры их молекулы лежит циклопентанпергидрофенантрен [2].

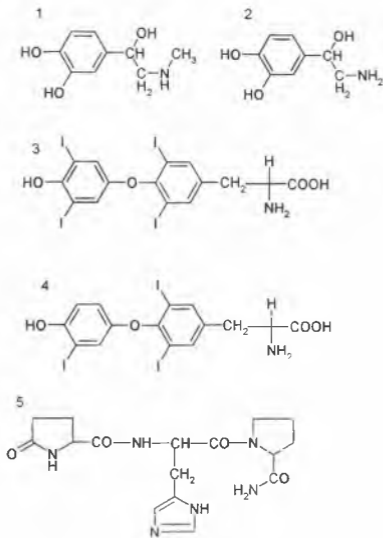


Рис. 6.1. Азотсодержащие гормоны:

1 – адреналин, 2 – норадреналин, 3 – тироксин,
4 – триодтиронин, 5 – тиролиберин

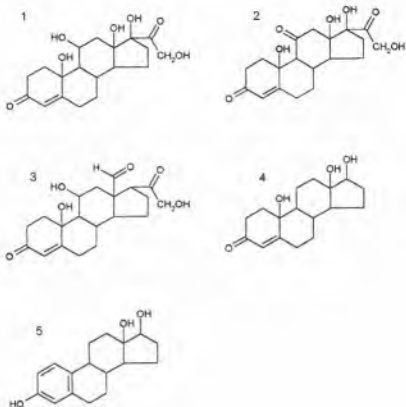


Рис. 6.2. Стероидные гормоны:

1 – гидрокортизон, 2 – кортизон, 3 – альдостерон,
4 – тестостерон, 5 – эстрадиол

6.1.2. Общие закономерности гормональной регуляции

Образование гормонов обычно происходит в специализированных клетках, функцией которых является синтез этих биологически активных соединений.

Как правило, один гормон продуцируют клетки одного типа. Например, кортикостероиды образуются в клетках коры надпочечников, тироксин – в клетках щитовидной железы. Обычно клетки, продуцирующие гормон, образуют специализированный орган – эндокринную железу. Иногда происходит формирование включений, состоящих из

популяции гормонпродуцирующих клеток, в эндокринных органах. Например, островки Лангерганса в поджелудочной железе.

Важная особенность гормонов – дистантность действия. Гормоны поступают в кровь и переносятся ею к органам и тканям, где реализуется биологический эффект.

Как было сказано, гормоны синтезируются в соответствующих эндокринных железах. Эндокринные железы реагируют изменением своего функционального состояния на всякие изменения внешней и внутренней среды.

Обычно железа секретирует в кровь небольшое количество гормона, которое называется базальным. Изменения активности железы происходят под влиянием соответствующих механизмов регуляции, специфичных для каждой железы. Многие железы регулируются системой гипоталамус – гипофиз. Например, биосинтез кортикостероидов в коре надпочечников стимулируется гормоном гипофиза кортикотропином. В свою очередь синтез этого гормона стимулируется гормоном гипоталамуса кортиколиберином. Возможна стимуляция желез внутренней секреции другими, не гипофизарными гормонами, нейромедиаторами, содержащимися в крови (ацетилхолин, серотонин и др.), различными метаболитами (глюкоза, аминокислоты), нервными импульсами.

Далее синтезированные гормоны из железы поступают в кровь. Там они связываются с белками плазмы и форменными элементами. Свободный гормон, растворенный в плазме, и комплекс гормона с белком находятся между собой в динамическом равновесии. Гормоны могут связываться как со специфическими белками, предназначенными для транспортировки именно этого гормона (например, кортикостероиды переносят белок транскортин), так и с неспецифическими.

Свободный, не связанный с белками гормон может подвергаться действию инактивирующих его ферментов. Необходимо отметить, что высокая активность двух одновременно существующих процессов – биосинтеза гормонов и их инактивации – дает возможность точно регулировать концентрацию гормонов и обеспечивать приспособление, адаптацию организма к постоянно изменяющимся условиям окружающей среды.

С током крови гормоны переносятся ко всем органам и тканям организма. У некоторых клеток имеются рецепторы, способные взаимодействовать с данным гормоном. Они представляют собой специфические белки. В результате взаимодействия гормона с рецептором в клетке происходят изменения активности тех или иных ферментов,

генов и другие процессы, которые и являются биологическим эффектом данного гормона. Ткани, в которых имеются рецепторы к данному гормону и реализуются его биологические эффекты, называются *тканями-мишенями*.

После выполнения своей биологической функции гормоны инактивируются соответствующими ферментами.

Некоторые полипептидные гормоны образуются из неактивных предшественников, или прогормонов. Такие неактивные предшественники имеют более длинные полипептидные цепи, чем соответствующие активные гормоны. Примером может служить проинсулин. Его полипептидная цепь содержит приблизительно 80 аминокислотных остатков. Активный инсулин содержит 51 аминокислотный остаток. Он образуется в результате ферментативного отщепления части полипептидной цепи. Прогормоны накапливаются в неактивной форме в эндокринной клетке, обычно в ее секреторных гранулах. После получения клеткой соответствующего сигнала прогормон способен быстро ферментативным путем превратиться в активный гормон.

Гормоны действуют в очень низких концентрациях и в большинстве случаев имеют короткое время жизни.

6.1.3. Роль гипоталамуса и гипофиза в регуляции работы эндокринной системы

Координирующим центром эндокринной системы является гипоталамус – специализированная область мозга, которая получает и интегрирует сигналы, идущие из ЦНС.

В гипоталамусе человека и животных образуются первые биологически активные гормональные вещества дистантного действия, которые получили название рилизинг-факторы (либерины) и ингибиторные факторы (статины). Эти вещества не попадают в общий круг кровообращения, а по специальной, так называемой воротной (портальной) системе сосудов поступают в гипофиз, а там каждое из них избирательно – в определенные клетки. Рилизинг-факторы стимулируют биосинтез и выделение гипофизарных гормонов; последние через общий круг кровообращения поступают в соответствующие органы, на которые направлено их действие. Например, кортикотропин, достигая коры надпочечников, стимулирует синтез кортикостероидов; лютропин, поступая в яичники, стимулирует синтез эстрогенов и т.д. Гормоны периферических желез, выделение которых регулируется гипофизарными гормонами, поступают в общий круг крово-

обращения и влияют на биохимические, а через них – и на физиологические реакции организма [3].

Следовательно, гипоталамус является связующим звеном между центральной нервной системой и железами внутренней секреции. Под его контролем находится деятельность гипофиза, связанная с выделением гормонов, осуществляющих регуляцию периферических эндокринных желез и роста. В системе гипоталамус-гипофиз импульсы, приходящие по нервным путям со всего организма, переключаются на гуморальный путь. Эта система в комплексе является по существу первым уровнем контроля, способным поддерживать базальную секрецию гормонов.

Для обозначения гормонов гипоталамуса, стимулирующих освобождение гипофизарных гормонов, часто используют название релизинг-фактор (от английского *release* – освободить), например, тиротропин-релизинг-фактор (ТРФ), соматотропин-релизинг-фактор (СРФ) и т.п. Для обозначения же гормонов гипоталамуса, тормозящих освобождение гормонов гипофиза, часто используют название «ингибирующий фактор». По общепринятой номенклатуре пептидных гормонов гипоталамические релизинг-факторы (гормоны) должны иметь окончание «либерин» (например ТРФ – тиролиберин; СРФ – соматолиберин и т.д.), а гипоталамические релизинг-ингибирующие факторы (гормоны) – окончание «статин» (например, соматостатин, то есть соматотропин-релизинг-ингибирующий фактор). Использовать сокращения не рекомендуется.

Считают, что в гипоталамусе существует, по крайней мере, шесть стимуляторов и три ингибитора секреции аденогипофизарных гормонов (табл. 6.1).

Из гормонов гипоталамуса получены в чистом виде тиролиберин, люлиберин и соматостатин, их структура установлена и подтверждена химическим синтезом. Все они являются олигопептидами, состоящими соответственно из 3, 10 и 14 аминокислотных остатков. Продолжается изучение и других гормонов гипоталамуса.

Тиролиберин – первый гормон гипоталамуса, у которого удалось установить химическую структуру. Он представляет собой низкомолекулярное соединение с молекулярной массой 412 Да. Это трипептид со следующей аминокислотной последовательностью: пироглутамил-гистидил-пролинамид.

Вторым химически исследованным гормоном гипоталамуса является люлиберин – декапептид со следующей последовательностью аминокислот:

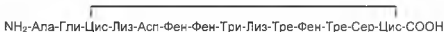
Пиро-Глу-Гис-Три-Сер-Тир-Гли-Лей-Арг-Про-Гли-NH₂ .

Гипоталамические гормоны, контролирующие освобождение гормонов гипофиза

Прежнее название	Новое название
Кортикотропин-рилизинг-фактор	Кортиколиберин
Тиреотропин-рилизинг-фактор	Тиролиберин
Рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона	Люлиберин
Рилизинг-фактор фолликулостимулирующего гормона	Фоллиберин
Рилизинг-фактор ростового гормона, или соматотропин-рилизинг-фактор	Соматолиберин
Соматотропин-ингибирующий фактор, или соматостатин	Соматостатин
Пролактин-ингибирующий фактор	Пролактостатин
Пролактин-рилизинг-фактор	Пролактолиберин
Рилизинг-фактор меланостимулирующего гормона	Меланолиберин
Меланоцитингибирующий фактор	Меланостатин

Примечание. В настоящее время выяснено, что функции люлиберина и фоллиберина выполняет один и тот же гормон гипоталамуса – гонадолиберин (люлиберин).

Соматостатин оказался 14-членным пептидом со специфической последовательностью аминокислот:



И в тиролиберине, и в люлиберине оба конца полипептидной цепи (NH_2 - и COOH -) не свободны, а блокированы, так как на N-конце находится циклическая пироглутаминовая кислота (вместо глутаминовой), в которой отсутствует свободная аминогруппа, а на С-конце OH-группа концевого карбоксила замещена NH_2 -группой. Такая структура рилизинг-факторов сообщает им относительную устойчивость к действию пептидгидролаз.

Соматостатин отличается от тиролиберина и люлиберина тем, что в нем концевые аминокислоты имеют свободные аминогруппу и карбоксильную группу.

Из гормонов гипоталамуса наибольшее число аминокислот входит в состав соматолиберина (44) и кортиколиберина (41).

Изучение химической структуры и механизма действия гипоталамических гормонов затруднено чрезвычайно малой их концентрацией в гипоталамусе, а отсюда и большими трудностями их получения. Так, для получения 1 мг препарата тиролиберина, гомогенного по всем критериям, пришлось переработать 7 т гипоталамусов, отобранных из 500 т ткани мозга от 5 млн. овец.

В результате взаимодействия гормонов гипоталамуса с определенными клетками гипофиза происходит регуляция секреции гормонов передней доли гипофиза: соматотропина, кортикотропина, фоллитропина, лютропина, прслактина, тиротропина, а также гормона промежуточной доли – меланотропина.

Гормоны передней доли гипофиза участвуют в регуляции основных биологических процессов, характеризующих жизненный цикл каждого индивидуума. Такие биологические явления, как рост и размножение позвоночных животных, в значительной мере зависят от нормальной деятельности гипофиза; его гормоны участвуют в регуляции всех видов обмена веществ: водного, минерального, углеводного, белкового и жирового. Многие из этих функций гипофиз регулирует путем стимуляции деятельности других желез внутренней секреции: коры надпочечников, щитовидной железы, половых желез и др. (рис. 6.3).

Соматотропин (соматотропный гормон, гормон роста). По химической природе этот гормон представляет собой простой белок. Изучение гормонов роста, полученных из передней доли гипофиза различных животных, показало, что в зависимости от вида животного молекулярная масса и последовательность аминокислотных остатков колеблется в широких пределах. У обезьян молекулярная масса соматотропина составляет 25 400, у человека – 27 000, у крупного рогатого скота – 46 000. Гормон роста способствует увеличению массы тела и росту костной системы. Он стимулирует синтез РНК-полимераз, усиливает проницаемость клеточных мембран для аминокислот.

Кортикотропин (адренокортикотропный гормон). Белок с молекулярной массой 20 000. Состоит из 39 аминокислотных остатков. Стимулирует синтез кортикостероидов в надпочечниках.

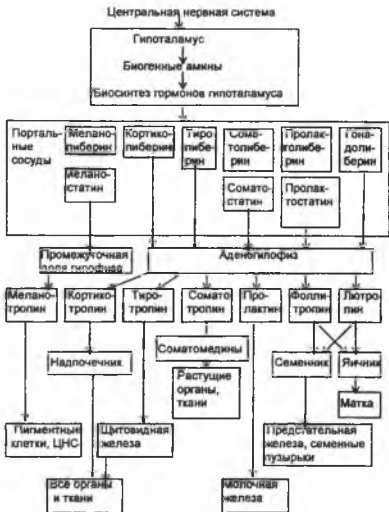


Рис.6.3. Схема гормональной регуляции функций организма

Тиротропин (тиреотропный гормон). Гликопротеид с молекулярной массой 30 000. Стимулирует синтез тироксина в щитовидной железе.

Пролактин (лактотропный гормон). Простой белок с молекулярной массой 24 000. Стимулирует функцию желтого тела яичника, вызывает усиление секреции молочных желез.

Фоллитропин (фолликулостимулирующий или гонадотропный гормон). Гликопротеид с молекулярной массой 67 000. Его отсутствие вызывает атрофию половых желез.

Лютропин (лютеинизирующий гормон, гормон, стимулирующий интерстициальные клетки). По химической природе гликопротеид. Его аминокислотная последовательность видоспецифична. Молекулярная масса этого гормона колеблется от 40 000 у овцы до 100 000 у свиньи. У самок лютеинизирующий гормон стимулирует рост фолликулов, овуляцию и образование желтого тела.

6.2. Рецепция гормонов

6.2.1. Внутриклеточный тип рецепции

Рецепторы этого типа локализуются в ядре. Гормоны относительно свободно проникают в клетку, далее – в ядро. Там они связываются с рецепторными белками хроматина, образуют комплексы, прочно закрепленные в ядре. Не нуждаются в посредниках – внутриклеточных медиаторах. Результатом взаимодействия гормона с рецептором является влияние образовавшегося комплекса на процесс транскрипции.

Раньше считалось, что рецепторы этого типа (например, стероидов) находятся в цитоплазме. Причина получения таких данных заключается в том, что не связанный с гормоном рецептор слабо связан с хроматином. Поэтому его концентрация в ядре и цитоплазме находится в динамическом равновесии. При биохимических методах выделения – гомогенизации в буферных растворах – по закону действия масс большая часть молекул рецепторов переходит в буфер из ядерной фракции. На этом основании часто делают вывод, что данные молекулы в клетке находятся в цитоплазме. При этом гормон-рецепторные комплексы закреплены в ядре [4].

Ядерные рецепторы представляют собой простые мономерные белки. Каждый рецептор кодируется одним геном. Молекулы рецепторов, не связанные с гормоном, легко переходят в водные и буферные растворы.

Структура рецептора включает не менее четырех структурно-функциональных единиц – доменов, участков белковой молекулы. Наибольшее значение для реализации биологических эффектов рецептора имеют домены С и Е.

Домен Е – это гормоносвязывающий фрагмент белковой молекулы рецептора. Его свойством является специфическое связывание молекулы гормона. Характерной особенностью структуры этого домена является наличие гидрофобного «кармана», специфически связывающего молекулу гормона с помощью водородных и гидрофобных связей. Различия в структуре сайта обуславливают узнавание гормона. Это очень консервативная структура. Так, рецепторы эстрогенов у различных видов животных имеют до 95% одинаковой аминокислотной последовательности. Конечным итогом связывания гормона является изменение конформации молекулы рецептора, которое передается на фрагмент С, взаимодействующий с ДНК.

Домен С, находящийся в середине молекулы рецептора, непосредственно взаимодействует с ДНК. Характерная структурная особенность домена С заключается в том, что он образует пальцевидные структуры, специфически взаимодействующие с ДНК.

Домен С является еще более консервативной структурой, чем домен Е. Межвидовая гомология однотипных рецепторов достигает 100%. Это объясняется тем, что изменение структуры приведет к нарушению взаимодействия гормон-рецепторного комплекса с ДНК.

Первая петля богата гидрофобными аминокислотными остатками и определяет взаимодействие рецептора с гормоночувствительным элементом по большой бороздке ДНК. Это особый регуляторный участок ядерной ДНК, обычно примыкающий к гормонозависимым структурным генам.

Вторая петля богата основными аминокислотными остатками – аргинином и лизином. Они обеспечивают электростатическую фиксацию на сахаро-фосфатных структурах ДНК [5].

6.2.2. Мембранный тип рецепции

Этот тип рецепции характерен для всех белково-пептидных гормонов, катехоламинов и большинства негормональных информонов.

В рецепции участвуют специфические трансмембранные белки. Обязательны внутриклеточные посредники.

Все трансмембранные белки – липофильные гликопротеины. Они содержат три структурных элемента:

- 1) экстрацеллюлярный – во внеклеточном пространстве;

2) трансмембранный – в толще мембранного бислоя;

3) интрацеллюлярный – в цитозоле.

В отличие от ядерных рецепторов, многие мембранные рецепторы к однотипным лигандам представлены несколькими различными белками. Они обуславливают разные эффекты соответствующего гормона в различных тканях или клетках.

Однопочечные рецепторные гликопротеины, структурно родственные с акцепторами. Это мономерные гликопротеины, не обладающие ферментативными или канальными функциями. Примерами могут служить рецепторы глюкагона, адреналина.

По своей структуре они представляют собой одну полипептидную цепь, которая состоит из 400-420 аминокислотных остатков. Вблизи N-конца к ней присоединены два углеводных остатка.

Характерная черта структуры рецептора – 7 гидрофобных α-спирализованных стопкообразных структур в толще мембраны. Три петли расположены внутри, три – снаружи мембраны, C-конец – в цитозоле. Связывающее место гормона находится, вероятно, у наружной поверхности мембраны в ее полости в третьей – четвертой «стопке».

Связывание гормона изменяет конформацию стопок и петель, повышая их сродство к G-белкам – специфическим акцепторам. В результате образуется тройной комплекс гормон-рецептор-G-белок. Он инициирует специфические гормональные эффекты в клетке.

Рецепторы, обладающие тирозинкиназной активностью. Общее свойство этих рецепторов – проявление особой формы протеинкиназной активности – тирозинкиназной. Тирозинкиназа фосфорилирует субстраты только по остаткам тирозина (а обычная – по остаткам серина и треонина).

Субстратом действия рецепторных киназ являются серин-треониновые протеинкиназы. Они активируют протеазу, расщепляющую мембранные гликопротеины. В результате образуются пептиды, которые играют роль внутриклеточных посредников.

К этой группе относятся рецепторы инсулина и соматотропина.

Рецепторы, обладающие свойствами ионных каналов. Примерами являются N-холинорецептор, рецепторы глутамата, серотонина. Они имеют различную структуру. В одну группу их объединяют по критерию сходства выполняемых функций.

Наиболее исследован N-холинорецептор. Это гетеропентамер. В его состав входят 4 типа субъединиц: две - α, по одной β, γ, δ.

α-Субъединицы, являющиеся гликопротеинами, выполняют функцию связывания ацетилхолина.

Образование комплекса с ацетилхолином вызывает конформационную перестройку трансмембранного домена субъединиц α , а затем и других субъединиц рецептора. Это обуславливает серию открываний и закрываний Na^+ -каналов. В результате возникает серия нервных импульсов в клетке-мишени.

Мономерные рецепторы лимфокинов. Это мембранные гликопротеиды. К их числу относятся рецепторы соматотропного гормона, эритропоэтинов. Они не обладают свойствами каналов, протеинкиназ, не взаимодействуют с G-белками, не влияют на активность фосфолипаз C, аденил- и гуанилциклаз. Есть данные об активировании гормон-рецепторным комплексом тирозинкиназ.

Возможно, что гормон-рецепторный комплекс, обладающий тирозинкиназной активностью, входит в клетку и действует на ее внутриклеточные структуры, в том числе ядерные. Это называется интернализацией гормон-рецепторного комплекса.

6.2.3. Механизмы трансмембранного проведения гормональных сигналов

Аденилатциклазный механизм. Рецепторы, сопряженные с аденилатциклазой, – это одноцепочечные белки, не обладающие ферментативной активностью или свойствами ионных каналов.

В одной клетке могут быть несколько типов рецепторов к разным гормонам, связанных с аденилатциклазой. В этом случае гормоны вызывают одинаковый эффект.

Действие разных гормонов на аденилатциклазу может быть как стимулирующим (повышающим ее активность в 10-50 раз), так и угнетающим (снижающим активность в два раза).

Стимулирующее влияние на аденилатциклазу оказывают адреналин, глюкагон, секретин, вазопрессин. Угнетающее – соматостатин, простагландины, ацетилхолин (через M-холинорецепторы).

Аденилатциклаза не является акцептором. Акцепторами, непосредственно взаимодействующими с аденилатциклазой и рецептором, являются G-белки (или N-белки). Они состоят из трех типов субъединиц – α , β , γ и находятся в мембране.

При отсутствии гормона G-белок соединяется с аденилатциклазой через α -субъединицу.

После образования гормон-рецепторного комплекса он присоединяет к себе G-белок. Далее α -субъединица присоединяется к аденилатциклазе, в результате чего изменяется ее активность.

Существует аналогичный, менее распространенный механизм внутриклеточной регуляции с участием цГМФ. Примером является механизм действия натрийуретического гормона предсердий.

цАМФ является аллостерическим регулятором протеинкиназы. В неактивной форме протеинкиназа состоит из 4 субъединиц – 2 каталитических и 2 регуляторных. Когда они объединены в один комплекс, фермент неактивен. Однако при связывании 4 молекул цАМФ со специфическими участками 2 регуляторных единиц комплекс распадается на свободные каталитические единицы, обладающие ферментативной активностью, и регуляторные единицы, в которых цАМФ остается в связанном виде. Таким образом, цАМФ снимает торможение протеинкиназной активности, которое возникает в результате присоединения регуляторной субъединицы к каталитической.

Далее активированная протеинкиназа катализирует фосфорилирование неактивной формы киназы фосфорилазы с помощью АТФ. Образуется активная фосфорилированная форма фермента. Киназа фосфорилазы переносит фосфатные группы от 2 молекул АТФ на гидроксильные группы двух остатков серина в молекуле гликогенфосфорилазы. В результате этого гликогенфосфорилаза превращается из неактивной формы «в» в активную «а»:



Далее эта активная форма фермента начинает расщеплять гликоген с образованием глюкозо-1-фосфата, который превращается в глюкозо-6-фосфат, а затем в свободную глюкозу. В свою очередь глюкоза поступает в кровь.

Описанная последовательность реакций включает достаточно большое количество стадий. Несмотря на это, активность гликогенфосфорилазы успевает достичь пика уже через несколько минут после связывания адреналина рецепторами клеток печени.

При этом возникает вопрос: почему регуляция происходит не на генетическом уровне, путем синтеза необходимых ферментов в нужном количестве в активной форме. Зачем нужно синтезировать «про запас» неактивные ферменты возможно в заведомо большем количестве, чем они необходимы? Биологический смысл этого процесса заключается в том, что для синтеза белка понадобится определенный срок. А описанная схема срабатывает в течение минут или секунд, поскольку все необходимые белки-ферменты уже заранее синтезированы.

Последовательность стадий, которую мы рассмотрели, можно представить как каскад усиления, то есть действия одних ферментов на другие. Каждая молекула фермента в этом каскаде активирует множество молекул следующего фермента.

Таким способом достигается значительное усиление поступающего сигнала в течение очень короткого времени. По имеющимся оценкам, это усиление может достигать 25 млн. раз. В результате связывание всего лишь нескольких сотен или тысяч молекул адреналина адrenoрецепторами клеток печени приводит к быстрому выбросу в кровь нескольких граммов глюкозы.

Описанный процесс протекает одинаково в печени и скелетных мышцах до образования глюкозо-6-фосфата. При этом в мышцах отсутствует фермент глюкозо-6-фосфатаза. По этой причине в них не образуется свободной глюкозы. В результате повышение концентрации глюкозо-6-фосфата в мышце приводит к значительному увеличению скорости гликолиза с образованием молочной кислоты. А именно этот процесс является важным источником АТФ, который используется в процессе сокращения мышц при физической нагрузке.

Установлено, что цАМФ является внутриклеточным посредником при реализации биологических эффектов не только адреналина, но и многих других гормонов. Протеинкиназа, активированная с помощью цАМФ, может фосфорилировать ряд важных ферментов в различных клетках-мишенях.

В стрессовой ситуации, пока животному угрожает опасность, мозговой слой его надпочечников выбрасывает в кровь адреналин. Аденилатциклазная система печени находится в активированном состоянии. В этот период уровень цАМФ в клетках мишенях остается достаточно высоким, что обеспечивает значительную скорость распада гликогена.

Как только опасность исчезает, секреция адреналина прекращается. Его концентрация в крови быстро снижается в результате ферментативного расщепления.

По мере того, как рецепторы становятся незанятыми, то есть освободившимися от гормона, аденилатциклаза возвращается в прежнее неактивное состояние. Образование цАМФ прекращается.

Находящийся в клетке цАМФ инактивируется ферментом фосфодиэстеразой. Этот фермент осуществляет гидролиз 3'-фосфатной связи в цАМФ. В результате образуется свободный 5'-АМФ.

По мере уменьшения содержания цАМФ в цитоплазме происходит диссоциация (по закону действия масс) комплекса цАМФ с регуляторными субъединицами протеинкиназы. После этого регулятор-

ные субъединицы вновь соединяются с каталитическими и протеинкиназа переходит в неактивную форму.

Фосфорилированная форма киназы фосфорилазы далее подвергается дефосфорилированию (также как и фосфорилаза «а») под действием фосфатазы *фосфорилазы*.

Все эти процессы возвращают систему гликогенолиза в исходное состояние. Одновременно происходит реактивация гликоген-синтазы путем ее дефосфорилирования.

Фосфоинозитный механизм. Рецептор не обладает собственной ферментативной активностью или свойствами ионного канала.

Гормон-рецепторный комплекс взаимодействует с G_i -белками. Это тот тип G -белков, которые ингибируют аденилатциклазу. Поэтому гормоны, использующие аденилатциклазный и фосфоинозитный механизмы – антагонисты. G_i -белки активируют в мембране фосфолипазу C. Этот фермент расщепляет содержащиеся в мембране в малых количествах фосфатидилинозитолы до диацилглицерола и 1,4,5-трифосфоинозитола.

Диацилглицерин активирует протеинкиназу C. Она фосфорилирует небольшое количество белков, стимулирующих пролиферацию клеток. Излишняя стимуляция может привести к опухолевому росту. Таким путем происходит стимуляция секреторного процесса в некоторых железах.

Трифосфоинозитол мобилизует Ca^{2+} из клеточных депо, прежде всего из цистерн эндоплазматического ретикулума. Ca^{2+} связывается с белком кальмодулином. Именно этот комплекс обуславливает эффекты Ca^{2+} в клетке.

Комплекс Ca^{2+} -кальмодулин взаимодействует с аденилатциклазой, гуанилатциклазой, фосфодиэстеразой циклических нуклеотидов.

Фосфоинозитный механизм характерен для вазопрессина, окситоцина, ангиотензина 2, брадикинина, а также норадреналина через α_1 -рецептор.

ГЛАВА СЕДЬМАЯ ВИТАМИНЫ И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ

К витаминам относятся низкомолекулярные органические вещества. Они представляют собой химически разнородную группу. Их общим характерным признаком является невозможность синтеза этих веществ биохимическими системами данного организма [1].

Биологическая роль разных витаминов также различна. Многие являются предшественниками коферментов (например, рибофлавин, пиридоксин, биотин, никотиновая кислота) или индукторами синтеза белков (ретиаль, ретинол, кальциферол), регулируют процессы химической модификации белков (аскорбиновая кислота) и участвуют в других метаболических процессах.

Витамины проявляют активность в малых количествах. Их дефицит ведет к появлению специфических нарушений обмена с характерными клиническими проявлениями.

По отношению к растворителям их делят на водорастворимые и жирорастворимые. Номенклатура витаминов основана на использовании заглавных букв латинского алфавита с индексами. Одновременно используются названия, отражающие химическую природу или функцию витамина.

7.1. Водорастворимые витамины

Наиболее важными для организма водорастворимыми витаминами являются витамины группы В, а также С и Н (рис. 7.1).

Витамин В₁ (тиамин). В организме из данного вещества образуется кофермент тиаминдифосфат (тиаминпирофосфат) путем переаминирования с АТФ. Это соединение входит в состав фермента транскетолазы, входящего в пентозофосфатный цикл. Кроме этого, тиаминдифосфат является коферментом декарбоксилирующих дегидрогеназ, которые обеспечивают окислительное декарбоксилирование пирувата и α -кетоглутарата.

При недостатке витамина В₁ вследствие угнетения транскетолазной реакции наблюдается уменьшение образования НАДФН. Это соединение служит источником протонов для различных процессов биосинтеза, в первую очередь липидов [2].

При недостаточном поступлении в организм витамина В₁ развивается полиневрит (бери-бери) с влажной или сухой формами протекания болезни. Влажная форма характеризуется сердечно-сосудистой недостаточностью, быстрым развитием отеков, атрофией мышц.

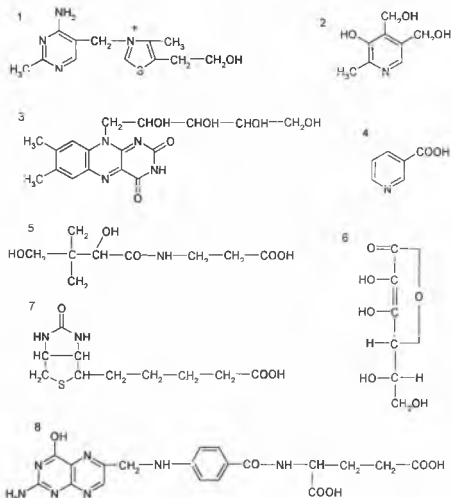


Рис. 7.1. Водорастворимые витамины:

1 – витамин В₁ (тиамин), 2 – витамин В₆ (пиридоксин), 3 – витамин В₂ (рибофлавин), 4 – витамин В₃ (никотиновая кислота), 5 – витамин В₅ – пантотеновая кислота, 6 – витамин С (аскорбиновая кислота), 7 – витамин Н (биотин), 8 – витамин В₉ (фолиевая кислота)

При сухой форме отмечаются периферические полиневриты, чувство страха, нарушение интеллекта, потеря веса, атрофия мышц.

В организм тиамин поступает с мясом, молоком, фасолью, горохом, дрожжами, хлебом грубых сортов.

Витамин В₂ (рибофлавин). Входит в состав коферментов ФМН и ФАД. Эти коферменты выполняют очень важные функции. Они осуществляют транспорт протонов и электронов от НАД-дегидрогеназ на кофермент Q. Кроме этого, они входят в состав ферментов, осуществляющих дегидрирование аминокислот, кето- и оксикислот.

Недостаток витамина В₂ проявляется трещинами в углах рта и на губах, изменением цвета языка, дерматитом. Содержится рибофлавин в молоке, печени, курином яйце, зеленых растениях.

Витамин В₃ (пантотеновая кислота). Входит в состав КоА. Этот кофермент принимает участие в дегидрировании и дегидратации ацильных остатков в составе ацил-КоА, например, в процессах β-окисления. Пантотеновая кислота также входит в состав ацилпереносящего белка и участвует в синтезе высших жирных кислот. Витамин В₃ содержится в мясе, молоке, печени, дрожжах.

Витамин В₅ (никотиновая кислота, витамин РР, ниацин, противопеллагрический фактор). Входит в состав НАД и НАДФ, коферментов дегидрогеназ. Их функции – транспорт водорода от окисляемых субстратов на флавопротеиды. В организме человека никотиновая кислота может синтезироваться из триптофана. Источником этого витамина являются мясные продукты, печень, ткани растений. При недостатке в организме никотиновой кислоты развивается пеллагра: повышается чувствительность кожных покровов к ультрафиолетовому излучению, возникает нарушение пищеварения, слабоумие.

Витамин В₆ (пиридоксаль). Образует кофермент фосфопиридоксаль, который участвует в реакциях переаминирования и декарбоксилирования аминокислот, биосинтезе сфинголипидов, в гликогенолизе, входит в состав моноаминоксидаз и диаминоксидаз, обезвреживающих биогенные амины.

При недостатке витамина наблюдается повышенная возбудимость, судороги, тошнота, дерматит. Содержится пиридоксаль в мясе, печени, почках, дрожжах, зернах злаков, зародышевой части семян.

Витамин В₉ или В₁₂ (фолиевая кислота, фолацин, птероилглутаминовая кислота). Коферментные формы фолиевой кислоты представлены формил- и метилпроизводными тетрагидрофолиевой кислоты. Они способны передавать метил в реакциях синтеза пуринов

и пиримидинов. При недостатке витамина наблюдается угнетение синтеза ДНК и пролиферации кроветворных клеток.

Фолиевая кислота содержится в капусте, салате, томатах, печени, мясе. Недостаточность этого витамина в организме обычно обусловлена нарушением его всасывания в кишечнике.

Витамин В₁₂ (цианкобаламин, кобаламин, антианемический фактор). В клетках этот витамин образует коферменты. Метилкобаламин является коферментом гомоцистеинметилтрансферазы. Этот фермент катализирует перенос метильной группы с N-метилтетрагидрофолиевой кислоты на гомоцистеин с образованием метионина. Деоксиаденозилкобаламин – кофермент метилмалонил-КоА-мутазы. Она катализирует превращение метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА. Эта реакция обеспечивает включение в цикл трикарбоновых кислот остатков пропионил-КоА, которые образуются при β-окислении жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. Витамин участвует в образовании коферментных форм фолиевой кислоты и поэтому оказывает влияние на синтез ДНК и пролиферацию кроветворных клеток.

Витамин синтезируется кишечными микроорганизмами. Содержится в дрожжах, молоке, печени, почках. Растительная пища бедна этим соединением. Недостаток витамина может быть вызван нарушением его всасывания в кишечнике, для чего необходим специальный белок.

Витамин С (аскорбиновая кислота). Аскорбиновая кислота является донором водорода в различных окислительно-восстановительных реакциях. При отдаче двух атомов водорода она превращается в дегидроаскорбиновую кислоту. Этот продукт может снова превратиться в аскорбиновую кислоту под действием фермента дегидроаскорбинредуктазы при участии глутатиона.

Аскорбиновая кислота участвует в образовании коллагена (превращении остатков пролина и лизина в оксипролин и оксилизин в проколлагене), в синтезе кортикостероидов, норадреналина, серотонина, карнитина, коферментных форм фолиевой кислоты, в процессах всасывания железа.

Недостаток витамина С вызывает цингу (расшатывание зубов, кровоизлияния, ухудшение заживления ран).

В организм аскорбиновая кислота поступает с фруктами и овощами.

Витамин Н (биотин). Является простетической группой ряда ферментов, которые катализируют включение CO₂ в органические соединения. Это ацетил-КоА-карбоксилаза, пропионил-КоА-карбокси-

лаза, метилмалонилтранскарбоксилаза, пируваткарбоксилаза. При недостатке биотина снижается способность тканей включать CO_2 в оксалоацетат и синтезировать высшие жирные кислоты.

Биотин синтезируется кишечной микрофлорой. Содержится в дрожжах и печени.

7.2. Жирорастворимые витамины

Наиболее важными для организма жирорастворимыми витаминами являются витамины А, Д, Е, К (рис. 7.2).

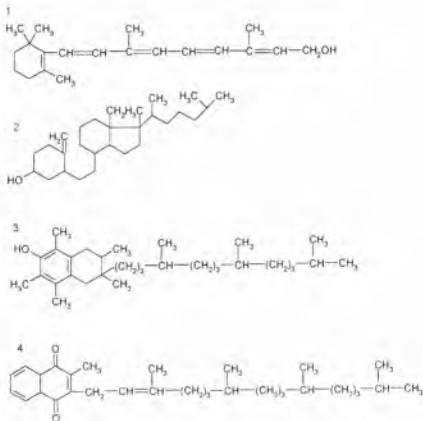


Рис. 7.2. Жирорастворимые витамины:

- 1 – витамин А (ретинол), 2 – витамин Д (холекальциферол),
3 – витамин Е (токоферол), 4 – витамин К (филлохинон)

Витамин А (ретинол, антиксерофтальмический фактор). Это группа жирорастворимых витаминов, производных β -иона. Витамин входит в состав зрительного пигмента родопсина в виде *цис*-ретинала.

В темноте *цис*-ретиноль взаимодействует с белком опсином с образованием сложного белка родопсина. На свету родопсин распадается на опсин и *цис*-ретиноль, который спонтанно превращается в *транс*-форму. Далее путем ферментативного восстановления с участием НАДН он превращается в *транс*-ретинол. Это вещество под влиянием специфической изомеразы преобразуется в *цис*-форму ретинола, который в дальнейшем при участии кофермента НАД окисляется в *цис*-форму ретинала.

Недостаток витамина А вызывает нарушение темновой адаптации, которая называется куриной слепотой, а также ксерофтальмию (сухость роговицы). В молодом возрасте возможна задержка роста.

При избытке в организме ретинол накапливается в гидрофобной фракции клеточных мембран, что приводит к их повреждению. Это редкий случай, когда избыток витамина вреден для организма.

Витамин содержится в животных тканях. Особенно много его в печени морских рыб и других животных. В растениях присутствуют предшественники витамина А – каротиноиды. В тканях животных и человека из каротинов образуется витамин А. В высоких дозах витамин А токсичен.

Витамин Д (кальциферол, антирахитический фактор). С пищей в организм человека поступают предшественники этого витамина. Наибольшее значение имеет 7-дегидрохолекальциферол. Из него под влиянием ультрафиолетового излучения образуется холекальциферол (витамин Д₃). Это вещество подвергается дальнейшим превращениям в печени и почках с образованием 1,25-диоксихолекальциферола. Это биологически активное соединение в слизистой оболочке кишечника способствует образованию белка, который связывает ионы кальция и обеспечивает их всасывание в кишечнике и реабсорбцию в почечных канальцах.

Недостаток витамина Д приводит к снижению кальция и фосфора в костной ткани. Это вызывает рахит у детей. Также наблюдается кариес.

В организм данный витамин и его предшественники поступают с печенью, молоком, растительным и сливочным маслом, рыбьим жиром.

Витамин Е (токоферол, антистерильный фактор). Витамин обеспечивает стабильность биологических мембран. Это связано с тем,

что он уменьшает интенсивность перекисного окисления жирных кислот в липидах. В силу этого же свойства токоферол защищает от перекисного окисления боковую цепь витамина А, повышая его биологическую активность.

При дефиците этого витамина активизируются свободнорадикальные реакции, приводящие к повреждениям биологических мембран. Это вызывает мышечную дистрофию вследствие высвобождения ферментов лизосом, атрофию семенников и бесплодие, рассасывание плода на ранних стадиях беременности, гемолитическую анемию.

Токоферол поступает в организм с растительными маслами. Кроме этого, он содержится в зеленом горошке, зародышевой части семян злаков.

Витамин К (филлохинон, антигеморрагический фактор). Является кофактором карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты в некоторых белках свертывания крови. Если данные белки не подверглись карбоксилированию, то в этом случае они становятся неактивными и не могут выполнять свои ферментативные функции.

При недостаточности витамина К наблюдается кровоточивость при небольших повреждениях, увеличение времени свертывания крови. Синтезируется кишечной микрофлорой. Кроме этого, витамин содержится в капусте, фруктах, дрожжах, печени.

7.3. Антивитамины

Антивитамины – это вещества, которые затрудняют использование витаминов, вызывая их разрушение, связывание или препятствуя выполнению ими своих метаболических функций. Например, они могут быть сходными с витаминами по строению молекулы и поэтому занимать их место в молекуле фермента вместо кофермента. Так, сульфаниламиды у микроорганизмов включаются вместо парааминобензойной кислоты в молекулу фолиевой кислоты и блокируют фолатзависимые реакции.

7.4. Микроэлементы

Микроэлементы – это химические элементы, которые содержатся в живых организмах в очень малых количествах. Это медь, железо, марганец, цинк, молибден, кобальт и другие [3].

Медь является необходимым для растений и животных микроэлементом.

В растениях количество меди составляет от 0,0001 до 0,05% на сухое вещество. У человека наибольшее количество меди содержится в печени – около 5 мг, в костях – 0,7 мг на 100 г сухой массы. Из животных наибольшие количества меди содержат моллюски и ракообразные. У них этот металл входит в состав гемоцианина.

Основная биологическая роль меди – участие в ферментативных реакциях. Она входит в состав некоторых ферментов или является их активатором. К числу медьсодержащих белков у растений относятся пластоцианин, оксидазы, у человека – тирозиназа, церулоплазмин. По этой причине отсутствие или недостаток данного металла в среде вызывает угнетение роста, так как организм не имеет возможности синтезировать соответствующие белки в нужном количестве.

Медь стимулирует кроветворную функцию костного мозга. При недостатке этого металла наблюдается анемия, снижение уровня сахара и фосфора в крови. Источником меди для человека являются фрукты, картофель, хлебобудничные продукты.

У злаковых растений недостаток меди в почве вызывает болезнь – экзантему. Оптимальные концентрации меди способствуют ускорению роста растений. Высокие количества металла являются токсичными.

Железо поступает в организм человека с пищей. Наиболее богаты им мясо, печень, яйца, фрукты, хлебобудничные продукты, бобовые. Металл всасывается в верхнем отделе тонкого кишечника, переносится с кровью в связанном с белками состоянии и депонируется в печени в виде комплекса с белком ферритином.

Железо входит в состав гемоглобина, миоглобина, цитохромов. При недостатке в организме этого металла возникает анемия. Выделение из организма происходит через стенку тонкого кишечника и через почки.

В природе существуют организмы, способные накапливать железо в больших количествах. Например, железобактерии содержат до 20% этого вещества. Недостаток железа у растений может стать причиной хлороза, поскольку этот металл принимает участие в синтезе хлорофилла.

Цинк поступает в организм человека в составе мяса, молока, овощей, хлебобудничных продуктов. Биологическая роль этого металла связана с тем, что он входит в состав большого числа ферментов. Это ДНК- и РНК-полимеразы, некоторые протеолитические ферменты, фосфатазы, дегидрогеназы, карбоангидраза. Цинк входит в состав рецепторов некоторых гормонов, повышает деятельность половых желез,

влияет на формирование скелета. Соответственно, недостаток этого металла приводит к карликовости, задержке полового развития. Избыток цинка вызывает токсический и канцерогенный эффект.

Марганец поступает в организм в составе хлебопродуктов. Встречается практически во всех органах и тканях. Наибольшие его количества находятся в костях, печени и гипофизе.

Марганец является активатором ряда ферментов. Недостаток этого металла отрицательно влияет на рост и развитие животных, вызывает анемию, нарушение минерального обмена костной ткани. Потребность в марганце повышается при физической нагрузке.

Значительное количество данного химического элемента по сравнению с позвоночными содержат некоторые моллюски, ракообразные, рыжие муравьи. Недостаток марганца у растений вызывает хлороз, некрозы и другие заболевания.

Молибден поступает в организм человека в основном с хлебопродуктами. Наибольшие его концентрации отмечены в печени, почках, глазах. Этот металл участвует в реакциях пуринового обмена у животных и человека, ускоряет рост. В высоких концентрациях токсичен, вызывает нарушения обмена веществ, задержку роста костей, подагру.

У клубеньковых бактерий молибден входит в состав нитрогеназы, участвует в фиксации азота. В растениях этот металл стимулирует биосинтез нуклеиновых кислот и белков, повышает концентрацию хлорофилла и витаминов.

Кобальт поступает в организм с овощами, хлебопродуктами, молоком. В наибольших количествах обнаружен в печени, селезенке, костях, яичниках, гипофизе, крови. Биологическая активность кобальта связана с тем, что он входит в состав витамина В₁₂ и его коферментных форм. Таким образом, от него зависит активность фермента транскарбоксилазы и других ферментов.

Кобальт является мощным стимулятором кроветворения и синтеза зритропоэтинов.

У клубеньковых бактерий кобальт участвует в фиксации атмосферного азота и соответственно стимулирует рост и продуктивность бобовых растений.

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ МЕТАБОЛИЗМ И БИОЭНЕРГЕТИКА

Особенности химических превращений в биосистемах

По сравнению с химическими процессами, протекающими в неживой природе и промышленных аппаратах, биохимические реакции, составляющие молекулярную основу всех жизненных процессов, имеют ряд существенных особенностей.

Прежде всего, практически все биохимические реакции протекают с участием биологических катализаторов – ферментов. Благодаря своей специфичности и способности на многие порядки ускорять протекание биохимических реакций, ферменты сформировали мощный направленный поток превращений веществ, который не ограничивается отдельными организмами, а захватывает всю биосферу, одновременно вовлекая в биосферный круговорот колоссальные массы материи из неживой природы и выбрасывая в нее конечные продукты жизнедеятельности. Одновременно биосферой образуется вновь приблизительно 100 млрд. тонн органического вещества в год. На этом фоне вся мировая химическая индустрия, годовая производительность которой в совокупности с металлургической и горнорудной промышленностью составляет ориентировочно 10 млрд. тонн, выглядит лишь жалкой кустарной мастерской. Уступает она биосфере также по разнообразию и сложности образующихся веществ. Не напрасно В.И. Вернадский в 1926 г. писал: "На земной поверхности нет химической силы более постоянно действующей, а потому и более могущественной по своим конечным последствиям, чем живые организмы, взятые в целом".

Биосферный круговорот обладает наследуемостью, поскольку строение и функции ферментов, организующих биохимические превращения в любом отдельном организме, генетически детерминированы.

Ферменты обладают совершенной управляемостью. Скорость реакции может быть изменена путем воздействия на конформацию фермента и концентрацию реагирующих веществ (ферментов, субстратов). Оба этих способа управления (интенсивный и экстенсив-

ный) широко используются в живой природе. Концентрация ферментов в клетке может быть повышена за счет их биосинтеза или понижена путем гидролитического расщепления. Как правило, в цепях взаимосвязанных биохимических реакций имеется аллостерический фермент, управляемый по механизму обратной связи путем воздействия эффекторов на его аллостерический центр. Таким образом, биохимические процессы в живых системах четко регулируются и тонко согласованы между собой с помощью сформировавшихся в процессе эволюции систем саморегуляции.

Специфической особенностью химических процессов, протекающих в живых системах, является наличие матричных синтезов нуклеиновых кислот, при которых построение одной молекулы осуществляется путем непосредственного комплементарного копирования другой готовой молекулы. По такому механизму происходят процессы редупликации и транскрипции. Принцип комплементарности проявляется и при трансляции белка на рибосоме в момент присоединения антикодона тРНК к кодону мРНК. Матричный механизм биосинтеза лежит в основе передачи и реализации генетической информации, обеспечивающей постоянное самовоспроизведение биосистем и протекающих в них биохимических процессов.

Для неживой природы характерны самопроизвольно протекающие реакции, ведущие к снижению свободной энергии системы и повышению ее энтропии. Основным источником энергии, обеспечивающим протекание биосферных процессов, является Солнце. Фотосинтезирующие организмы преобразуют световую энергию в химическую путем синтеза биомолекул, свободная энергия которых выше суммарной свободной энергии исходных веществ. В клетках существуют специальные молекулы, несущие избыток химической энергии (например, АТФ), который может быть израсходован на биосинтез макромолекул (белков, нуклеиновых кислот). Таким образом, в живой природе наряду с процессами деградации, ведущими к увеличению энтропии, протекают антиэнтропийные (негэнтропийные) процессы, которые понижают ее.

В живых системах наряду с унифицированными (общими) биомолекулами существуют сходные совокупности биохимических реакций и молекулярные механизмы осуществления внутриклеточных процессов. В клетках разных организмов сходным образом протекают процессы гликолиза, окислительного фосфорилирования, биосинтеза белков, нуклеиновых кислот и т. д. Благодаря такой унификации происходит размножение вирусов в клетках с использованием биосинтетического аппарата последних; в клетках бактерий осуществляется

образование чужеродных белков, закодированных на молекулах рекомбинантной ДНК, и т.д. Даже половое размножение было бы невозможно без способности соответствующих систем яйцеклетки считывать генетическую информацию, внесенную клеткой другого организма (мужской гаметой).

Все многообразие химических процессов протекает не в однородном объеме клетки, а в специализированных внутриклеточных структурах, ориентированных на выполнение определенных функций. Например, биосинтез нуклеиновых кислот происходит преимущественно в ядре, белка – на рибосомах, АТФ – в митохондриях, большой набор гидролитических ферментов (десятки наименований) запасен в лизосомах. В этих компартментах и органеллах имеется специализированный набор ферментов и созданы оптимальные условия для их функционирования, в частности соответствующая концентрация водородных ионов (рН).

Биохимические процессы протекают в достаточно узком диапазоне температур, поскольку с понижением последней быстро уменьшаются скорости ферментативных реакций, а повышение ее сверх определенного значения может привести к тепловой денатурации ферментов. Многие организмы обладают способностью поддерживать температуру своего тела на постоянном, оптимальном для протекания биохимических реакций уровне.

Поскольку метаболизм различных групп биомолекул имеет свои особенности, его соответствующим образом и подразделяют (метаболизм белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов и т.д.). Следует однако помнить, что это подразделение достаточно условно, так как химические превращения всех веществ тесно связаны между собой, образуя единую систему – метаболизм (обмен веществ) всего организма.

ГЛАВА ВОСЬМАЯ МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ

8.1. Круговорот азота в биосфере

Первичным, усваивающим процессом на Земле является фотосинтетическая, восстановительная фиксация CO_2 фотосинтезирующими бактериями и растениями, приводящая к образованию углеводов; синтеза всех остальных органических соединений биосферы (в

том числе белков) начинаются с промежуточных продуктов метаболизма углеводов.

Азот, необходимый для синтеза аминокислот (а следовательно, и белков), находится в окружающей среде, составляя большую часть (до 80%) всех молекул воздуха (78% объема атмосферы). В биосфере он существует преимущественно в виде химически очень инертного N_2 . От снабжения азотом атмосферы на нашей планете зависит жизнь организмов, которые принимают активное участие в круговороте азота на Земле [1].

Способность к фиксации атмосферного азота присуща многим прокариотам, в том числе бактериям (*Azotobacter*, *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella*, *Rhizobium*). Бактерии *Rhizobium* фиксируют азот преимущественно в симбиозе с растениями – в корневых клубеньках бобовых; фиксировать азот также могут и некоторые из свободно живущих бактерий *Rhizobium*. Кроме бобовых, хозяевами азотфиксирующих микроорганизмов являются актиноризные растения (облепиха, ольха, лох и др.), а некоторые из голосеменных растений содержат азотфиксирующие синезеленые водоросли. Синезеленые водоросли (цианобактерии) имеют наиболее важное значение среди свободно живущих азотфиксирующих организмов – в частности, они могут фиксировать в год от 2,4 до 10 г азота на каждый квадратный метр рисового поля.

Биологическая фиксация азота обеспечивается нитрогеназой (нитрогеназной ферментной системой), катализирующей шестизлектронное восстановление N_2 в аммиак:



В состав нитрогеназной системы входят по крайней мере два различных белка, а также молибден (Mo) и негеминовое железо (Fe-S). Процесс переноса электронов при участии нитрогеназы является АТФ-зависимым. В качестве источников электронов (для восстановления N_2 в NH_3) при метаболизме служат различные соединения, в том числе НАДФН и восстановленный ферредоксин (железосодержащий белок).

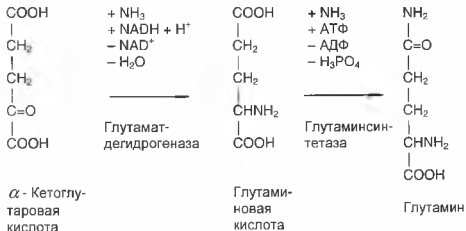
Растения и животные лишены способности связывать атмосферный азот и в этом отношении полностью зависимы от различных азотфиксирующих организмов, связывающих ежегодно в среднем 1% атмосферного азота (от 0,75 до 1,5%). Однако несмотря на столь существенную ежегодную биологическую фиксацию атмосферного азота различными бактериями, его содержание в атмосфере остается стабильным в связи с тем, что микроорганизмы других видов пре-

вращают последовательно нитрат (NO_3^-) в нитрит (NO_2^-), а нитрит в N_2 , который возвращается в атмосферу.

8.2. Включение аммиака в аминокислоты и белки. Образование аминокислот в организме животных

Продукт фиксации азота микроорганизмами (NH_3) может прямо использоваться как микроорганизмами, так и растениями для синтеза всех азотосодержащих органических соединений и, прежде всего, аминокислот. Фиксация NH_3 происходит в основном через реакции аминирования и трансаминирования [2].

Наиболее легко аммиак включается в глутаминовую кислоту путем реакции аминирования α -кетоглутаровой кислоты, образующейся в цикле трикарбоновых кислот, с последующим включением аммиака и в глутамин:



Использование глутаматдегидрогеназы для образования глутаминовой кислоты возможно благодаря обратимости глутаматдегидрогеназной реакции. Глутаминсинтетаза для проявления активности требует присутствия Mg^{2+} .

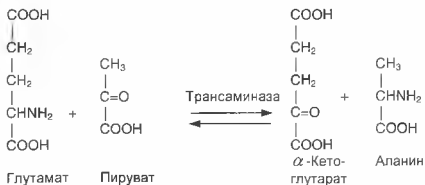
Пара α -кетоглутарат/глутамат, а также глутамин широко используются в метаболическом цикле азота; при этом α -кетоглутарат является главным акцептором азота, а глутамат и глутамин – главными переносчиками азота.

Аналогично щавелевоуксусная кислота (оксалоацетат) путем реакций аминирования или трансаминирования (с глутаматом) превращается в аспарагиновую кислоту, а затем в аспарагин.

В результате реакций трансаминирования пирувата с глутаматом или аспартатом образуется аланин. Глутамат, аспартат, их амины и аланин служат как бы «воротами», через которые неорганический азот входит в азотистые вещества микроорганизмов и растений, в том числе в состав всех других аминокислот, необходимых для синтеза белков.

Человек и другие высшие животные необходимые для них аминокислоты получают преимущественно с пищей в составе растительных, животных и бактериальных белков. Некоторые аминокислоты (заменимые) в случае их отсутствия или недостатка в пище, могут синтезироваться в тканях человека и животных (при избытке других аминокислот) преимущественно путем реакций трансаминирования. В процессе реакций трансаминирования происходит перенос аминогруппы ($-NH_2$) от аминокислоты на α -кетокислоту без промежуточного образования аммиака. Эти реакции обратимы и являются универсальными для всех живых организмов [3].

В качестве типичного примера можно привести обратимую реакцию взаимопревращения глутаминовой кислоты и аланина с участием пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот – путем реакции трансаминирования, впервые открытой А.Е. Браунштейном и М.Г. Крицман в 1937 г.:



Незаменимые аминокислоты должны поступать в организм млекопитающих только с пищей, так как у них в тканях не происходит образования кето-(оксо-)кислот, необходимых для синтеза тех или иных незаменимых аминокислот путем трансаминирования. У жвачных животных возможно использование аммиака для синтеза аминокислот, в том числе незаменимых, симбиотическими микроорганизмами, обитающими в преджелудках.

В природе существует около 300 аминокислот. В белках растений, животных и микроорганизмов обнаружены 20 из них, причем в растительных и животных белках встречаются только L-аминокислоты, а в бактериальных – L- и D-аминокислоты. D-аминокислоты, выявленные в клеточной стенке микроорганизмов и в составе некоторых синтезируемых ими антибиотиков, в организме человека и животных не используются.

Возможность построения специфических по первичной структуре различных белков практически неисчерпаема. Поэтому в процессе эволюции живых организмов возникло огромное разнообразие белковых молекул, имеющих не только межвидовые, но и внутривидовые различия. Следовательно, аминокислоты (кроме D-аминокислот), входящие в состав белков микроорганизмов, растений и животных, универсальны и лишены специфичности, в то время как построенные из них белки могут иметь не только видовую, но и индивидуальную для каждого организма специфичность.

8.3. Фонд свободных аминокислот

В организме человека и животных в течение всей жизни непрерывно происходят процессы синтеза белков, необходимых для увеличения количества клеток и в целом массы органов и тканей у растущих организмов («синтез роста» – структурных и других белков), для осуществления в организме разнообразных функций («функциональный синтез» – ферментов, регуляторных пептидов, сократительных белков, гемоглобина, иммуноглобулинов и др.), для восстановления поврежденных тканей («восстановительный синтез» – белков соединительной ткани, белков пролиферирующих при регенерации ткани клеток), для постоянного обновления белков всех тканей.

Скорость обновления белков в различных тканях различна. Например, обновление половины белков печени и сыворотки крови совершается в среднем за 10 дней, еще медленнее обновляются белки мышц и особенно соединительной ткани.

Для непрерывно протекающего в тканях синтеза белков, а также других биологически активных азотосодержащих соединений (медиаторов, низкомолекулярных пептидов, фосфолипидов и др.) необходимо постоянное наличие в организме общего фонда (пула) свободных аминокислот. Источниками общего фонда аминокислот могут быть продукты гидролиза экзогенных (пищевых) и эндогенных (тканевых) белков, а также аминокислоты (заменяемые), синтезируемые в тканях преимущественно путем реакций переаминирования. Считается, что примерно 2/3 общего фонда аминокислот в организме имеет эндогенное, а 1/3 – экзогенное происхождение. В организме человека, например, ежедневно распадается на аминокислоты в среднем 400 г белков (из общего количества 15 кг), то есть до 2,7%.

Важная роль в поддержании необходимого количественного и качественного состава общего фонда аминокислот в организме принадлежит желудочно-кишечному тракту, в котором происходит постоянное смешивание эндогенных и экзогенных белковых молекул и продуктов их гидролиза – аминокислот. Эта смесь аминокислот может быть одним из источников резервного фонда (метаболического пула) аминокислот.

В желудочно-кишечном тракте происходит переваривание белков пищи (растительного и животного происхождения), бактериальных белков и белков пищеварительных соков. В частности, у человека в составе пищеварительных секретов за сутки выделяется в кишечник около 50 г белков, в основном ферментов, которые тоже перевариваются, а аминокислоты всасываются. Исследования содержания азота аминокислот в кишечнике лабораторных, сельскохозяйственных животных и у человека показывают их относительное постоянство, независимо от уровня принятого белка. В кишечном химусе человека и животных содержится в среднем, 0,2% азота.

Секреция эндогенного белка и его гидролиз в кишечнике, различная скорость всасывания аминокислот и процессы переаминирования, протекающие в стенке кишечника, значительно изменяют состав аминокислотной смеси потребленного с пищей белка и тем самым способствуют поддержанию относительного постоянства аминокислотного состава в содержимом кишечника (химусе).

Вероятно, периодическая секреция пищеварительных желез у человека и животных с однокамерным желудком (а у некоторых травоядных – постоянная) в периоды между приемами пищи (даже во время голодания) и постоянный при этом обмен белками и аминокислотами между кровью и кишечником служат основными факторами поддержания относительного постоянства метаболического пула

аминокислот в кишечном содержимом и в плазме крови. Фонд свободных аминокислот организма человека составляет около 30 г.

Учитывая отсутствие в организме человека и животных особых (резервных) отложений белков, именно наличие относительно постоянного фонда свободных аминокислот объясняет возможность активного ресинтеза белков при недостаточном поступлении белков с пищей и даже в период длительного голодания. При этом поддержание метаболического пула аминокислот происходит путем гидролиза собственных легко мобилизуемых белков тканей и, прежде всего, печени, плазмы крови, слизистой оболочки кишечника, мышц с образованием свободных аминокислот, используемых для синтеза цитоплазматических белков, ферментов, гормонов и других биологически активных соединений, абсолютно необходимых для обеспечения нормальной деятельности жизненно важных органов (мозга, сердца). В частности, при голодании синтезируемые в пищеварительных железах (за счет распада белков других тканей) ферменты поступают в пищеварительный тракт, где подвергаются гидролизу до аминокислот, пополняющих фонд свободных аминокислот как в содержимом кишечника, так и (после всасывания) в плазме крови.

Хотя пластическая роль белков, составляющих основу всех клеточных структур и обладающих полифункциональностью, неизмеримо превышает их значение как источника энергии, наличие метаболического пула аминокислот может иметь существенное значение для их превращения в безазотистые органические вещества и, в первую очередь, в наиболее легко мобилизуемый источник энергии – глюкозу.

Процесс глюконеогенеза из аминокислот у плотоядных животных, в пище которых практически отсутствуют углеводы, является основным источником глюкозы, необходимой для обеспечения энергетических потребностей мозга, мышц и других тканей. У травоядных доля глюконеогенеза из аминокислот может достигать 50% потребности животных в глюкозе.

У человека и животных усиление глюконеогенеза из аминокислот и распада белков (вследствие повышения концентрации в крови глюкокортикоидов) для пополнения фонда свободных аминокислот может происходить в адаптационную стадию стресса, что способствует поддержанию в плазме крови содержания глюкозы в концентрации, достаточной для адаптации организма (в энергетическом отношении) к действию стрессорных факторов. Однако при очень интенсивном или продолжительном воздействии стрессоров на организм наступает стадия истощения, сопровождающаяся уменьшением фонда сво-

бодных аминокислот, снижением скорости синтеза РНК и белков в периферических тканях (особенно в лимфоидной и мышечной), поражением желудочно-кишечного тракта («стероидная язва»), атрофией мягких тканей, усилением деградации белков, в результате чего может наступить летальный исход.

Уменьшение фонда свободных аминокислот в организме возможно и при других нарушениях процессов регуляции обмена веществ, в том числе при сахарном диабете. Известно, что при резком снижении содержания инсулина в крови нарушается поступление глюкозы внутрь клеток. При этом происходит повышение концентрации глюкозы в крови и выведение ее с мочой. Недостаток глюкозы в клетках в условиях дефицита инсулина вызывает развитие тяжелого энергетического голода и активизацию всех контринсулярных гормонов, обеспечивающих гомеостаз глюкозы в организме (глюкагона, катехоламинов, глюкокортикоидов и др.), в том числе за счет усиления распада белков до аминокислот, используемых для глюконеогенеза. Однако и образующаяся из аминокислот глюкоза также (при дефиците инсулина) не поступает в клетки, а преимущественно выводится из организма с мочой, что ведет к дальнейшему уменьшению фонда свободных аминокислот и компенсаторному распаду белков для поддержания его относительного постоянства. При длительном течении сахарного диабета, в условиях длительного распада белков, резкого уменьшения фонда свободных аминокислот, нарушения синтеза белков и других процессов обмена веществ возможно развитие расстройства кровообращения, ишемической болезни сердца, мышечной атрофии, почечной недостаточности, гангрены конечностей и т.д.

8.4. Ферментативный гидролиз белков

В пищеварительном тракте и в тканях человека и животных непрерывно протекают процессы гидролиза белков при участии ферментов пептидгидролаз.

Белки пищи никогда не включаются в состав тканей тела без предварительного расщепления до аминокислот и простых пептидов, лишенных видовой, тканевой и индивидуальной (для каждого организма) специфичности и способных проходить через мембраны эпителиальных клеток. Лишь у некоторых видов млекопитающих, в том числе у всех копытных, возможен переход (путем пиноцитоза) из кишечника в кровь (в течение нескольких часов или дней после рождения) нативных (без гидролиза) молекул иммуноглобулинов молозива, обеспечивающих у новорожденных создание пассивного гуморально-

го иммунитета. У взрослых животных всех видов аминокислоты являются основной формой, в которой азот пищи всасывается из кишечника в кровь.

В тканях возможен полный гидролиз белков до аминокислот, пополняющих фонд свободных аминокислот, а также частичный протеолиз, ведущий к образованию новых биологически активных пептидов [4].

В переваривании белков в желудочно-кишечном тракте участвуют пептидгидролазы, катализирующие разрыв пептидных связей как у концевых аминокислот (экзопептидазы), так и между неконцевыми аминокислотами, то есть внутри полипептидной цепи (эндопептидазы). Пептидгидролазы обладают выраженной в большей или меньшей степени субстратной специфичностью, определяемой природой радикалов аминокислот по соседству с гидролизуемой пептидной связью.

К **эндопептидазам** относятся пепсин и реннин (химозин) желудочного сока; трипсин, химотрипсин и эластаза поджелудочного сока (действующие в тонком кишечнике).

Пепсин гидролизует (в кислой среде) пептидные связи преимущественно рядом с фенилаланином, тирозином, лейцином, а у взрослых людей и животных катализирует свертывание молока (превращение растворимого казеиногена в нерастворимый казеин). Функцию свертывания молока в раннем возрасте выполняет (более активный в этом отношении, чем пепсин) фермент **реннин**, который содержится в желудочном соке детей грудного возраста, а также в сычуге телят (часто называемый химозином) и других молодых жвачных животных.

Трипсин гидролизует (в слабощелочной среде – как и другие ферменты поджелудочного сока) пептидные связи рядом с аргинином или лизином; **химотрипсин** – предпочитительно пептидные связи, образованные карбоксильными группами гидрофобных аминокислот (тирозина, триптофана, фенилаланина, лейцина); **эластаза** – рядом с аминокислотами, имеющими небольшие незаряженные боковые цепи (глицин, аланин), и только в эластине.

В результате гидролитического действия эндопептидаз на белки образуются различной длины пептиды и некоторое количество свободных аминокислот.

Дальнейший гидролиз пептидов до свободных аминокислот осуществляется в кишечнике **экзопептидазами**: карбоксипептидазами поджелудочной железы, аминокислотами и дипептидазами (синтезируемыми клетками кишечника).

Карбоксипептидазы разрывают пептидную связь с карбоксильного конца пептида: цинксодержащая карбоксипептидаза А укорачивает пептид, отщепляя от него ароматические или другие гидрофобные аминокислоты; карбоксипептидаза В отщепляет основные аминокислоты; карбоксипептидаза С действует на все С-концевые аминокислоты.

Аминопептидазы катализируют отщепление аминокислот с аминного конца (то есть имеющего свободную аминогруппу). Имеются аминопептидазы, отщепляющие от пептида преимущественно аланин (аланинаминопептидаза), аргинин (аргининаминопептидаза) и другие аминокислоты. Аспаратаминопептидаза отщепляет от пептида аспарагиновую и глутаминовую кислоты. Лейцинаминопептидаза обладает широкой специфичностью, отщепляя с N-конца как лейцин, так и другие аминокислоты.

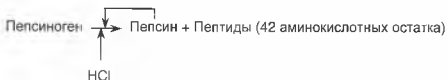
Дипептидазы специфически катализируют гидролиз только дипептидов с образованием двух аминокислот. Например, глицилглициндипептидаза разрывает пептидную связь лишь в дипептиде (глицилглицине) и не атакует трипептид глицилглицилглицин, то есть для действия этого фермента необходимо наличие около гидролизуемой пептидной связи свободных аминной и карбоксильной групп.

Одни дипептидазы гидролизуют пептидные связи между двумя определенными аминокислотами (глицилглициндипептидаза, глициллейциндипептидаза, глутамилглутаматдипептидаза, цистеинилглициндипептидаза), для других имеет значение наличие одной из них (аминоацилгистидиндипептидаза, аминоациллизиндипептидаза).

Последовательное действие пептидгидролаз в желудке и кишечнике приводит к гидролизу большинства белков пищи до аминокислот, которые всасываются из кишечника в кровь, пополняя фонд свободных аминокислот.

Все пищеварительные пептидгидролазы (часто называемые протеолитическими ферментами) синтезируются клетками желудка, кишечника и поджелудочной железы в неактивной форме – в виде **проферментов** (зимогенов), что имеет определенный биологический смысл, предотвращая разрушение белков клеток, в которых образуются проферменты. Превращение проферментов в активные ферменты происходит под влиянием специфических агентов или других ферментов (возможно и аутокаталитически) в полости желудка и кишечника, слизистая оболочка которых защищена от активных пептидгидролаз слоем слизи, а каждая клетка – полисахаридами на наружной поверхности плазматической мембраны.

Неактивный пепсиноген в желудке активируется в присутствии соляной кислоты вначале медленно – путем гидролиза пептидной связи между Лей₄₄ и Иле₄₅ и отщепления при этом от N-конца 42 аминокислотных остатков (в виде коротких пептидов). По мере образования небольших количеств активного пепсина аутокаталитический процесс активации пепсиногена резко ускоряется:



Активация трипсиногена происходит при участии фермента энтеропептидазы (прежнее название – энтерокиназа), синтезируемого клетками кишечника. Энтеропептидаза отщепляет от N-конца трипсиногена гексапептид путем гидролиза пептидной связи между Лиз₆ и Иле₇. Аналогично действует и образующийся активный трипсин, участвующий в аутокаталитическом превращении трипсиногена в трипсин.

Трипсин активирует и все другие проферменты поджелудочной железы (рис. 8.1) путем их частичного избирательного протеолиза:

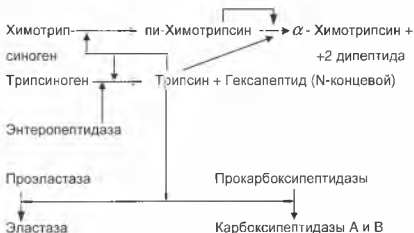


Рис. 8.1. Схема активации пептидгидролаз поджелудочной железы

В химотрипсиногене, состоящем из 245 аминокислот (одна полипептидная цепь), вначале под действием трипсина расщепляется лишь одна пептидная связь между Arg_{15} и Ile_{16} . Образующийся при этом пи-химотрипсин обладает полной ферментативной активностью и в том числе действует (наряду с трипсином) на другие молекулы пи-химотрипсина, удаляя из них по два дипептида ($\text{Ser}_{14}\text{-Arg}_{15}$ и $\text{Tre}_{147}\text{-Asn}_{148}$), в результате чего образуется более стабильная форма фермента – α -химотрипсин. Три фрагмента, образовавшиеся из исходной цепи химотрипсиногена, удерживаются вместе дисульфидными связями.

В регуляции активности пептидгидролаз поджелудочной железы решающая роль принадлежит энтеропептидазе кишечника, под действием которой скорость превращения трипсиногена в трипсин в 2000 раз выше скорости аутокаталитической активации под действием трипсина. При этом образующийся из трипсиногена трипсин осуществляет активацию всех остальных проферментов в соответствующие активные формы ферментов, катализирующих одновременно гидролиз различных пептидных связей.

Поджелудочная железа является одним из органов, наиболее активно синтезирующих белки, и помимо рассмотренного выше предотвращения гидролиза тканевых белков путем синтеза неактивных пептидгидролаз (проферментов) в ней существует другой путь – использование специфического ингибитора трипсина. Панкреатический ингибитор трипсина через свой Lys_{15} прочно соединяется электростатической связью с Asp_{189} субстратсвязывающего участка активного центра трипсина, обратимо ингибируя его активность, а следовательно, и активность других панкреатических пептидгидролаз. Основная роль ингибитора трипсина – предотвращение преждевременного образования свободных (активных) пептидгидролаз в клетках поджелудочной железы. В тонком кишечнике ингибитора не так много, чтобы воспрепятствовать действию больших количеств трипсина, образующегося из трипсиногена.

Таким образом, пептидгидролазы пищеварительных желез образуются в их клетках в виде проферментов и активируются в полости желудка и кишечника путем частичного протеолиза – гидролиза одной пептидной связи, после чего происходят конформационные изменения полипептидной цепи и завершается формирование активного центра данного фермента.

Помимо желудочно-кишечного тракта все ткани человека и животных содержат большой набор внутри- и внеклеточных пептидгидролаз, которыми особенно богаты печень, почки, селезенка.

Внутриклеточные пептидгидролазы тканей (часто называемые катепсинами) по механизму действия и специфичности близки к пепсину, трипсину, карбокси-, аминопептидазам, дипептидазам пищеварительного тракта и нередко изолированы от других внутриклеточных белков, будучи заключены в гранулы, органоиды (лизосомы и др.). Например, катепсин D по специфичности сходен с пепсином, акрозин (акросомальная пептидгидролаза сперматозоидов) обладает трипсиноподобной активностью, катепсин С (дипептидилпептидаза) отщепляет дипептиды от N-конца, карбоксикатепсин – от С-конца.

Клетки печени и некоторых других тканей могут улавливать белки гемолизированных эритроцитов, белковые и пептидные гормоны, денатурированные белки и после их гидролиза возвращать свободные аминокислоты в общий фонд организма.

Лизосомные пептидгидролазы фагоцитов участвуют в лизисе фагоцитированных клеток путем гидролиза белков состарившихся и поврежденных клеток своего организма, а также микроорганизмов.

В настоящее время появляется все больше данных о том, что процессы частичного протеолиза характерны не только для желудочно-кишечного тракта (для превращения неактивных проферментов в активные ферменты), но и для других органов и тканей. Практически во всех тканях человека и животных пептидгидролазы выполняют важную биологическую роль в регуляции ряда внутри- и внеклеточных процессов путем частичного протеолиза полипептидных цепей в посттрансляционный период, в том числе в образовании из предшественников активных гормонов, тканевых ферментов, защитных белков, а также их инактивации. Так, например, в синапсах гипоталамуса, гипофиза, клетках костного мозга из общего предшественника – **проопиокортина** (134 аминокислотных остатка) образуются путем частичного протеолиза кортикотропин (39 аминокислотных остатков) и β -липотропин (91 аминокислотный остаток). Из проопиокортина образуются и 2 меланотропина (α и β), один из которых (α) является фрагментом (13 остатков) кортикотропина, другой (β) – фрагментом (у большинства животных 18, у человека 22 остатка) β -липотропина. Кроме того, из β -липотропина также путем частичного протеолиза освобождаются пептиды, действующие подобно опиатам (эндорфины и энкефалины), обладающие (как и морфин) способностью снимать ощущение боли. Наиболее изучены β -эндорфин (61-91 последовательности аминокислот в β -липотропине), δ -эндорфин (61-79 последовательности), γ -эндорфин (61-77 последовательно-

сти), α -эндорфин (61-76 последовательности), метэнкефалин (61-65 последовательности).

Участки соединения между будущими гормонами в проопиокортине содержат пары основных остатков аминокислот (Лиз – Арг, Арг – Арг, Лиз – Лиз).

Образование инсулина происходит путем последовательного отщепления от препроинсулина (состоящего из 107 аминокислотных остатков) сначала сигнальной последовательности (специальной пептидгидролазой) из 23 аминокислотных остатков с образованием проинсулина (84 остатка), а затем (трипсиноподобной пептидгидролазой) соединительного пептида из 33 остатков аминокислот. Связующий пептид содержит Арг – Арг на N-конце и Лиз – Арг на C-конце. Частичный протеолиз именно по этим положительно заряженным остаткам приводит к отщеплению соединительного пептида и формированию инсулина (в аппарате Гольджи).

Учитывая что границы между активными гормонами и в проопиокортине, и в проинсулине, а также в пропаратгормоне представлены парами основных остатков аминокислот, по-видимому, именно эти пары остатков в различных прогормонах служат теми сигнальными отметинами, которые указывают, в каких участках должен произойти последующий частичный протеолиз.

В качестве примера инактивации гормона при участии пептидгидролаз можно привести инактивацию инсулина в печени, при однократном прохождении через которую разрушается около 80% инсулина. В печени инсулин последовательно подвергается действию редуктазы, SH-глутатион которой является донором водородных атомов для разрыва дисульфидных связей между двумя полипептидными цепями инсулина, и инсулиназы (пептидгидролазы), осуществляющей гидролиз полипептидных цепей.

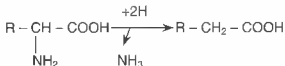
Серию актов активации проферментов путем их частичного протеолиза включают в себя процессы активации свертывающей и антисвертывающей систем крови, образования вазоактивных пептидов (ангиотензина и брадикинина), а также активация системы компонента, завершающаяся образованием мембраноатакующего комплекса пептидгидролаз, разрушающих мембраны многих бактериальных клеток.

8.5. Превращения аминокислот в организме

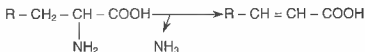
Часть образовавшихся в организме в процессе обмена веществ и всосавшихся из кишечника аминокислот используется для синтеза белков (ферментов, гормонов, антител, структурных и др.), пептидов (ансерина, карнозина, глутатиона, регуляторных и др.), новых (заменимых) аминокислот и многочисленных биологически активных азотосодержащих веществ: пуринов, пиримидинов, ацетилхолина, адреналина, тироксина, серотонина, никотинамида, креатина и др. Не использованные для синтеза азотосодержащих веществ аминокислоты используются для пополнения фонда свободных аминокислот в организме, а некоторое их количество подвергается глубокому распаду с образованием конечных продуктов – NH_3 , CO_2 , H_2O и освобождением потенциальной энергии, составляющей у взрослого человека в среднем около 10% от потребности организма в энергии. При этом часть метаболитов, образующихся при распаде аминокислот, используется для синтеза углеводов и липидов.

При распаде аминокислоты прежде всего теряют свою аминогруппу – этот процесс называется **дезаминированием**. В живых организмах возможны 4 пути дезаминирования аминокислот:

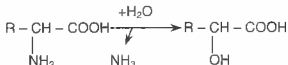
– восстановительное, с образованием предельной карбоновой кислоты



– внутримолекулярное, с образованием непредельной карбоновой кислоты

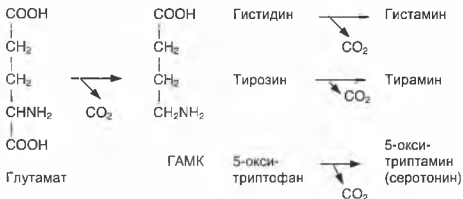


– гидролитическое, с образованием гидроксикислоты

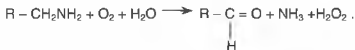


кислот, коферментом которых, как и у трансминаз, является пиридоксальфосфат.

Среди биогенных аминов, образующихся в результате декарбоксилирования аминокислот, можно назвать γ -аминомасляную кислоту (ГАМК), играющую важную роль в процессах торможения в центральной нервной системе; гистамин, обладающий сосудорасширяющим действием, способствуя активации защитных сил организма в очаге воспаления, принимает участие в болевом синдроме; тирамин, используемый для синтеза адреналина и норадреналина; серотонин – предшественник гормона мелатонина в эпифизе, медиатор в центральной нервной системе, а также участвует (совместно с гистамином) в воспалительной реакции:



Амины подвергаются в тканях окислительному дезаминированию с образованием альдегидов и аммиака:



Альдегиды окисляются в соответствующие жирные кислоты, которые подвергаются окислению до H_2O и CO_2 через цикл трикарбоновых кислот.

8.6. Образование, транспорт и пути выделения аммиака из организма

В организме человека и животных непрерывно протекают процессы синтеза и распада белков. У здорового человека за сутки обнов-

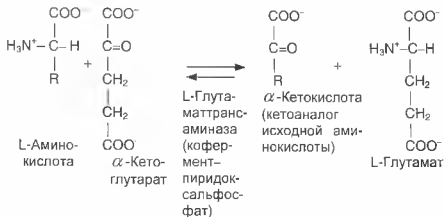
ляется 1-2% белков тела, которые распадаются преимущественно до аминокислот. 75-80% высвободившихся при гидролизе белков аминокислот снова используются в синтезе белков, а 20-25% подвергаются процессам катаболизма. В катаболические процессы вовлекается и часть всосавшихся из кишечника аминокислот, не вошедших в состав новых белков и других азотосодержащих соединений.

В настоящее время известно, что появляющиеся в организме в избытке аминокислоты, независимо от источника, не вошедшие сразу в состав новых белков и других биомолекул, а также в фонд свободных аминокислот, не запасаются (в отличие от жирных кислот и глюкозы), но и не выводятся из организма в неизменном виде, а подвергаются распаду. При этом возможны как полный распад аминокислот до продуктов азотистого обмена, CO_2 и H_2O с освобождением энергии, так и превращение метаболитов аминокислот в глюкозу, кетоны и другие органические соединения.

Катаболизм аминокислот сопровождается их дезаминированием с образованием аммиака. Аммиак высокотоксичен, особенно для мозга, его накопление в организме ведет к тяжелым последствиям. Однако образовавшийся в организме аммиак, как правило, быстро устраняется за счет связывания α -кетоглутаровой кислотой и пируватом при участии имеющихся в большинстве тканей двух трансаминаз (аминотрансфераз) – аланинтрансаминазы и глутаматтрансаминазы, с образованием, соответственно, глутамата и аланина.

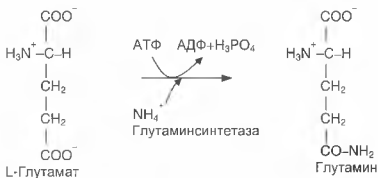
Аланин особенно интенсивно образуется в мышцах и кишечнике, в меньших количествах – в почках. Главным местом поглощения аланина является печень, где он может служить субстратом глутаматтрансаминазы, тем самым подвергаясь реакции трансаминирования с α -кетоглутаратом, в результате которой образуется глутамат и пируват, используемый в печени главным образом для глюконеогенеза. Глюкоза, образовавшаяся в печени в результате реакций глюконеогенеза, кровью доставляется как в мышцы, так и в другие органы и ткани. Реакция образования глутамата из аланина в результате трансаминирования очень важна, так как L-глутамат является единственной аминокислотой в тканях млекопитающих, которая может с большой скоростью подвергаться окислительному дезаминированию в печени (важному звену цикла образования мочевины).

Таким образом, для большей части реакций трансаминирования общим акцептором аминогрупп от различных аминокислот (в том числе от аланина) является α -кетоглутарат:



В реакциях трансминирования реального дезаминирования (потери аммиака) не происходит. При этом аминогруппы от разных аминокислот накапливаются в одной форме – в виде L-глутамата, единственного продукта катаболизируемых аминокислот.

Образовавшийся L-глутамат служит для того, чтобы направить аминокислоты на различные биосинтетические пути или на путь реакций образования и выведения продуктов азотистого обмена из организма. Из многих периферических тканей (мозга, мышц, почек и др.) значительная часть аминного азота поступает в кровь в виде глутамин, синтезируемого при участии глутаминсинтетазы:



Глутамин нетоксичен, нейтрален, мембрана клеток более проницаема для него, чем для глутамата, и, возможно, поэтому глутамин является основной транспортной формой аммиака в организме. Частично аммиак может транспортироваться в виде аспарагина, синтезируемого при участии аспарагинсинтетазы (аналогично глутамину),

а также в виде аланина. В почках часть аммиака (в небольшом количестве) выводится с мочой в виде глутамина, аспарагина и аммонийных солей. Основная же масса аммиака из организма млекопитающих, черепах, лягушек, акул (уреотелические животные) выделяется в виде мочевины, у птиц, рептилий, змей (урикотелические животные) – в виде мочевой кислоты, у костных рыб и личинок амфибий (аммониотелические организмы) – в виде аммиака.

Появление различных механизмов выведения из организма аминного азота в филогенезе в значительной мере обусловлено средой обитания и образом жизни животных [1,5] (см. гл. 19).

8.7. Биосинтез мочевины

Как указано выше, основная масса аминного азота у многих наземных животных, в том числе у всех млекопитающих, выделяется в виде мочевины, которая синтезируется в печени.

Основной транспортной формой аминного азота в организме человека и других млекопитающих является глутамин, а из мышц и кишечника в печень доставляется, помимо глутамина, аланин.

Одной из первых теорий синтеза мочевины была теория, предложенная М.В. Ненцким. В конце XIX в. М.В. Ненцкий доказал, что мочевина синтезируется в печени, и предположил, что этот синтез происходит в результате взаимодействия конечных продуктов обмена белков – углекислоты и аммиака:



В начале XX в. существовало мнение о том, что мочевина образуется в печени не в результате ее синтеза, а при гидролизе аргинина, освобождающегося из белков при их распаде в тканях. Косвенным подтверждением этого мнения было открытие немецким биохимиком А. Косселем (1903) в печени аргиназы, осуществляющей гидролиз аргинина на орнитин и мочевины. Однако вскоре расчеты показали, что для выделения взрослым человеком в среднем 30 г мочевины (около 15 г азота) в сутки при ее образовании из аргинина необходим гидролиз 150 г аргинина (7500 г белка), что нереально.

Почти через 30 лет после открытия аргиназы Г. Кребс и К. Гензельт (1932) при добавлении орнитина или цитруллина наблюдали ускорение образования мочевины в печени. Ими подтверждено образование мочевины в печени путем гидролиза аргинина, но образовавшегося заново из CO_2 и NH_3 , при участии орнитина, который выполняет каталитическую функцию, высвобождаясь в конце каждого цикла синтеза мочевины.

В последующем было установлено, что реакции, завершающиеся образованием аргинина, свойственны всем организмам, способным синтезировать аргинин, но только уреотелические животные обладают достаточным количеством аргиназы, катализирующей необратимую реакцию гидролиза аргинина, с образованием мочевины и орнитина. При этом регенерированный орнитин может быть использован для нового оборота цикла.

Различные стадии цикла образования мочевины (рис. 8.2) протекают в клетках печени – в матриксе митохондрий (синтез карбамоилфосфата и цитруллина) и в цитозоле (другие реакции, завершающиеся образованием мочевины).

Таким образом, для синтеза мочевины в качестве источников азота используются как свободный аммиак (образующийся преимущественно в результате глутаматдегидрогеназной реакции), который вовлекается в орнитиновый цикл через карбамоилфосфат, так и аминный азот аспартата.

Реакция образования карбамоилфосфата весьма эндергонична (требует разрыва макроэргических связей в двух молекулах АТФ) и для ее протекания необходимо присутствие N-ацетилглутамата, роль которого не вполне понятна.

Реакция биосинтеза аргининосукцината также эндергонична и сопровождается разрывом двух макроэргических связей одной молекулы АТФ, в том числе в образующемся при гидролизе АТФ пиррофосфате.

Образование аргинина при расщеплении аргининосукцината сопровождается освобождением фумарата. Фумарат связывает между собой циклы мочевины и трикарбоновых кислот, одним из продуктов которого он является. Имеют место и другие связи между этими двумя циклами. Реакции переаминирования и дезаминирования иногда дают, помимо фумарата, и другие продукты цикла трикарбоновых кислот (α -кетоглутарат, оксалоацетат). Из цикла трикарбоновых кислот в цикл мочевины поступают CO_2 и основная часть энергии (в форме АТФ), а оксалоацетат может быть предшественником аспар-

тата, необходимого для синтеза аргининосукцината в цикле мочевины.

Уреотелические животные на синтез мочевины затрачивают около 15% энергии тех аминокислот, которые служат источником азота для этого синтеза.

У человека и животных с однокамерным желудком вся мочевина, синтезируемая в печени, выделяется из организма с мочой, и тем самым полностью теряется энергия, затраченная на синтез мочевины.

У взрослых жвачных животных, имеющих многокамерный желудок, потери энергии на синтез мочевины в некоторой мере возмещаются задержкой части синтезируемой мочевины в организме, поступлением ее из крови в рубец (через стенку рубца и со слюной). В рубце (передней камере преджелудков) мочевина подвергается гидролизу (при участии уреазы бактериального происхождения) до CO_2 и аммиака, используемого симбиотическими микроорганизмами рубца для синтеза аминокислот (в том числе незаменимых), а из них – бактериального белка. При этом используются кетокислоты (α -кетоглутарат, пируват и др.), образующиеся в рубце при распаде углеводов и других продуктов.

После гибели микроорганизмов (главным образом за счет сильно кислой среды в сычуге) происходит гидролиз бактериальных белков ферментами пищеварительных желез до аминокислот, которые всасываются в кровь и вовлекаются в процессы азотистого обмена, в том числе для утилизации в организме хозяина, и синтеза мочевины.

У крупного рогатого скота количество мочевины, поступающей из крови в рубец, в значительной мере зависит от содержания белка в рационе питания – чем больше дефицит белка в рационе, тем больше мочевины задерживается в организме и меньше выделяется через почки.

У верблюда поступление мочевины в рубец и возвращение продуктов ее метаболизма (аминокислот, аммиака и др.) из кишечника в кровь и печень служит не только восполнению дефицита белка в рационе, но и сокращает у животного потери воды, неизбежные при выделении мочевины с мочой, то есть является одним из биохимических и физиологических приспособлений, дающих возможность верблюду обходиться относительно малым количеством воды.

При участии микроорганизмов в рубце жвачных происходит распад значительной части растительных белков корма (40-80%) до аминокислот и конечных продуктов (CO_2 , NH_3 , H_2O) и синтез заново белка микробного, более полноценного по аминокислотному составу, чем растительные белки.

Таким образом, в рубце взрослых жвачных постоянно происходят процессы распада и синтеза белков, а также процессы распада мочевины (поступающей со слюной или через стенку рубца) и синтеза из продуктов ее распада микробного белка (рис.8.3). Следовательно, в рубце жвачных всегда имеются условия использования мочевины и других азотосодержащих соединений (в качестве источников азота) для синтеза белка – при его дефиците в рационе. Однако замена части белка в рационе даже взрослых жвачных животных небелковыми азотосодержащими соединениями, в том числе мочевиной, требует соблюдения некоторых ограничений: должно быть обеспечено наличие достаточного количества легкопереваримых углеводов, витаминов, макро- и микроэлементов (в качестве питательной среды для микроорганизмов); постепенное увеличение дозы азотистых небелковых веществ в рационе (для адаптации микроорганизмов к повышенному содержанию аммиака в рубце при гидролизе амидов); нельзя давать мочевины с питьевой водой (во избежание транзита мочевины в неизменном виде через рубец в другие отделы желудочно-кишечного тракта).

В организме человека и животных с однокамерным желудком, а также у жвачных раннего возраста (до завершения развития преджелудков и микробиоценоза в них) нет условий для использования мочевины в качестве источника азота для синтеза белка. Более того, у них возможно отравление продуктами гидролиза мочевины (главным образом аммиаком) при ее поступлении в организм с пищей в связи с тем, что в желудочно-кишечном тракте человека и животных всех возрастов всегда имеются микроорганизмы, вырабатывающие уреазу, что необходимо учитывать при хранении и использовании мочевины.

8.8. Нарушения структуры и обмена белков. Наследственные заболевания

✓ Нарушения структуры и обмена белков могут быть вызваны нарушением экспрессии генов на любой стадии: транскрипции, модификации 5'- и 3'- концов полинуклеотидной цепи («КЭП» и полиА), процессинга (удаление интронов), трансляции. Эти нарушения нередко обусловлены мутациями генов, которые, с одной стороны, оказывают влияние на эволюцию видов, с другой – могут выполнять патогенетическую роль, вызывая различные заболевания и даже летальный исход. Причем мутации половых клеток (и их проявления) передаются из поколения в поколение потомству, а мутации соматических клеток

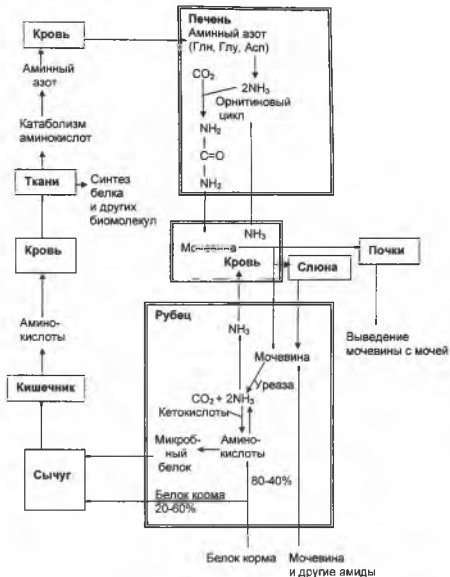


Рис. 8.3. Основные пути превращений азотосодержащих веществ в организме жвачных

передаются лишь от одного поколения клеток следующему, но не передаются потомству [6].

Мутации могут быть вызваны физическими (радиация и др.), химическими (мутагенными) и биологическими (онкогенными вирусами) факторами. Возможны и спонтанные мутации, вызываемые преимущественно мобильными (подвижными) диспергированными генами, имеющими сходную с онкогенными вирусами структуру. Частота спонтанных мутаций возрастает пропорционально повышению температуры окружающей среды, вероятно, вследствие ускорения химических реакций. У человека в молодом возрасте частота мутаций у обоих полов одинакова. Примерно с 30-го года жизни частота мутаций мужских половых клеток возрастает исключительно за счет возраста отца, возможно вследствие постоянной пролиферации сперматозоидов в процессе сперматогенеза на протяжении всей жизни. Отсутствие учащения мутаций яйцеклеток, вероятно, связано с тем, что процесс оогенеза происходит однократно (лишь внутриутробно), с последующим созреванием яйцеклеток без их деления.

Различают точковые мутации (замена одного основания в ДНК на другое), делеции (выпадение части генома), вставки лишних нуклеотидов, перестройки ДНК.

Последствия мутаций могут быть различными:

– молчащие мутации – не изменяют смысла кодона (например, при замене третьего нуклеотида триплета);

– нейтральные мутации – когда происходит замена на сходную аминокислоту (например, Иле на Лей) в стратегически не очень важном участке белка;

– патогенные мутации – чаще всего возникают в участке ДНК, несущем информацию об активном центре ферментов или о последовательности аминокислот в стратегическом участке белка (например, замена аминокислоты в области контакта между двумя субъединицами).

Развитие болезни чаще всего связано с наследственной недостаточностью или отсутствием одного-единственного фермента в организме больного или заменой одной аминокислоты на другую в биологически важной молекуле белка (например, в гемоглобине).

Наиболее известными наследуемыми заболеваниями, связанными с нарушением структуры и функции белков, являются серповидноклеточная анемия, недостаточность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, галактоземия, фенилкетонурия [7].

При серповидноклеточной анемии в гемоглобине (HbS) происходит замена в положении 6 β -цепи одной аминокислоты (Глу в HbA)

на валин, которая ведет к полимеризации дезоксиформы HbS и его осаждению в виде длинных волокон, деформирующих эритроцит, придавая ему серповидную форму. Эритроциты с HbS менее стабильны, чем с HbA, скорость их разрушения больше, наступает анемия, отставание развития. В раннем детском возрасте серповидноклеточная анемия иногда заканчивается смертью. Для популяции в целом появление мутаций HbS в эритроцитах может быть полезно, так как в них хуже развивается малярийный плазмодий, в связи с тем, что аминокислоты HbS недоступны для паразита в качестве источника питания.

Недостаточность в эритроцитах глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ведет к нарушению образования НАДФН, который предохраняет эритроцит от повреждения окисляющими агентами и тем самым от преждевременного распада. При этой недостаточности имеет место эффект защиты от малярии вследствие более раннего (при недостатке НАДФН) распада эритроцитов, наступающего прежде, чем паразит достигнет полной зрелости. При преждевременном гемолизе эритроцитов гибнут и развивающиеся в них паразиты, не вызывая заболевания.

Галактоземия вызывается накоплением галакто-1-фосфатидилтрансферазы, катализирующей превращение галактозо-1-фосфата в уридин-дифосфатгалактозу.

Накопление в тканях галактозо-1-фосфата блокирует метаболизм глюкозо-1-фосфата, вероятно, путем присоединения галактозо-1-фосфата к активному центру ферментов, метаболизирующих глюкозо-1-фосфат (конкурентное ингибирование). При этом нарушается обмен глюкозы, возникает недостаток АТФ, развиваются тяжелые расстройства функций печени, селезенки, почек, умственная отсталость и др.

Фенилкетонурия развивается при недостаточности фенилаланин-4-монооксигеназы, при участии которой происходит превращение фенилаланина в тирозин. При блокировании превращения фенилаланина в тирозин развивается классическая фенилкетонурия, сопровождающаяся у детей прогрессирующей умственной отсталостью. При этом накапливающийся в организме фенилаланин подвергается изменениям по альтернативным путям, с образованием фенилпропионовой, фенилмолочной и фенилуксусной кислот, а также фенил-ацетилглутамин (конъюгата фенилацетата с глутамином). У образовавшихся продуктов остается нерасщепленным бензольное кольцо, поэтому они не подвергаются дальнейшим превращениям и накапли-

ваются в организме, вызывая повреждение тканей, прежде всего нервной.

Возможны и другие наследственные заболевания, вызываемые нарушением активации ферментов, а также их дезактивации, дефектами белков ионных каналов, рецепторных белков, пептидных гормонов.

У некоторых взрослых людей имеет место непереносимость лактозы вследствие отсутствия в кишечнике лактазы, что указывает на возможность нарушения в ходе онтогенеза регуляции включения процесса транскрипции гена лактазы.

При лечении некоторых наследственных нарушений структуры и обмена белков существенным фактором является соблюдение соответствующей диеты, например, исключение из пищи галактозы (молока) при галактоземии; предотвращение прогрессирования развития фенилкетонурии у детей достигается использованием диеты с очень низким содержанием фенилаланина.

Перспективно лечение наследственных болезней методами генной инженерии путем включения в геном больного плазмид с рекомбинантной ДНК, содержащей тот ген, который дефектен у больного.

Возможно клонирование гена в предшественниках клеток костного мозга. Однако ген, перенесенный в соматические клетки, потомкам не передается. Для передачи генов потомству используют методы инъекирования генов в оплодотворенные яйцеклетки.

8.9. Азотистые небелковые вещества, их синтез, распад и биологическая роль

Помимо белковых молекул, в живых организмах встречаются и многочисленные небелковые азотистые вещества:

– свободные аминокислоты и их амиды, которые могут быть предшественниками как белков, так и других биологически активных молекул;

– мононуклеотиды (АМФ, ФМН, АДФ, АТФ и др.) и динуклеотиды (НАД, НАДФ, ФАД и др.) – как свободные, так и в составе сложных белков (в том числе ферментов), нуклеиновых кислот и т.д.;

– некоторые витамины (тиамин, пиридоксамин, кобаламин, никотинамид и др.);

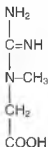
– аминсахара (глюкозамин, галактозамин и др.);

– фосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, сфингофосфолипиды и др.);

- гормоны, медиаторы и другие производные аминокислот (тироксин, трийодтиронин, катехоламины, гистамин, серотонин, ацетилхолин, γ -аминомасляная кислота, креатин, фосфокреатин, креатинин и др.);
- полиамины (путресцин, кадаверин, спермидин, спермин);
- биологически активные ди-, три-, олигопептиды, синтезируемые как по нематричному (карнозин, ансерин, глутатион, офтальмовая кислота и др.), так и по матричному (гормоны гипоталамуса, эндорфины, энкефалины и другие нейропептиды) механизмам;
- окись азота (NO);
- продукты гниения белков в кишечнике (индол, скатол, фенол и др.);
- конечные продукты обмена азотистых веществ (мочевина, мочевая кислота, аллантаин, соли аммония и др.);
- азотосодержащие ксенобиотики, поступающие в организм с пищей, в том числе алкалоиды и пептидные антибиотики.

Большинство из вышеуказанных азотистых веществ охарактеризовано в соответствующих разделах учебного пособия, в связи с чем в данном разделе более подробно будет дана характеристика лишь некоторых из них.

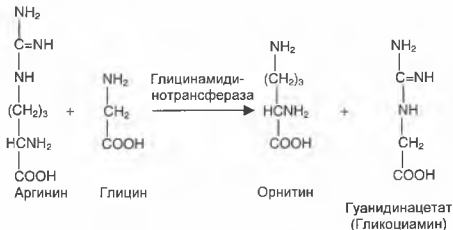
Креатин (метилгуанидин-ацетат)



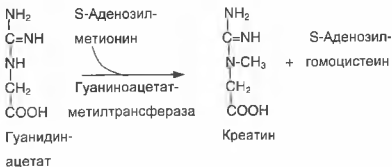
Креатином наиболее богаты интенсивно сокращающиеся скелетные мышцы и сердечная мышца, причем в мышце левого желудочка сердца (обеспечивающего поступление крови в большой круг кровообращения) креатина больше, чем в правом желудочке. Встречается креатин и в ткани мозга.

Образование креатина начинается в почках, завершается в печени, а накапливается он преимущественно в мышцах. В синтезе креатина участвуют три аминокислоты – глицин, аргинин и метионин [4].

В почках образуется гуанидинацетат путем реакции трансамидирования, в которой донором является аргинин, а акцептором – глицин:



В печени гуанидин (транспортируемый из почек кровью) метилируется «активным метионином» (S-аденозилметионином), превращаясь при этом в креатин, в свою очередь транспортируемый кровью в другие ткани:



Креатин может фосфорилироваться за счет АТФ с образованием **креатинфосфата**. Креатинкиназа, катализирующая данную реакцию, содержится везде, где имеется креатин, но наибольшая ее активность отмечена в скелетных мышцах:

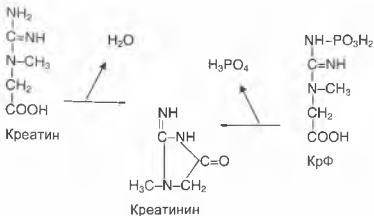


Креатинкиназная реакция легко обратима. В мышце соотношение свободного креатина и КрФ зависит от ее функционального состояния. В покое мышце содержание КрФ в 3-8 раз больше, чем содержание АТФ, вследствие преобладания синтеза КрФ, выступающего при этом в качестве депо энергии. КрФ предотвращает быстрое истощение АТФ при переходе от покоя к работе мышцы, поставляя легко используемый макроэргический фосфат для ресинтеза АТФ из АДФ.

Образование АТФ за счет КрФ – наиболее быстрый путь генерации АТФ, предшествующий включению других механизмов (анаэробного и аэробного путей образования АТФ за счет использования углеводов и других субстратов окисления).

В мышцах многих беспозвоночных функцию, аналогичную креатинфосфату позвоночных, выполняет аргининфосфат, а у большинства червей – гликоциаминфосфат. Креатинфосфат, аргининфосфат и гликоциаминфосфат, служащие запасными источниками энергии, нередко называют фосфагенами.

Конечным продуктом метаболизма креатина и креатинфосфата в мышцах является **креатинин**, образующийся в результате необратимых неферментативных реакций дегидратации креатина и дефосфорилирования креатинфосфата:

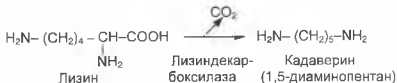


Креатинин выделяется из организма с мочой, не подвергаясь реабсорбции из первичной мочи в нефронах почек. Суточное выделение креатинина с мочой у каждого индивидуума относительно постоянно и пропорционально общей мышечной массе.

Полиамины

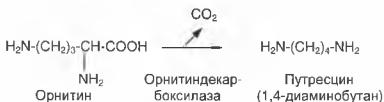
К полиаминам относят широко распространенные в живой природе соединения, образующиеся при декарбоксилировании диамино-монокарбоновых аминокислот (путресцин, кадаверин) и производные путресцина (спермидин и спермин), синтезируемые путем переноса на путресцин углеродной цепи метионина (включая аминогруппу) [6]. Среди них давно известны имеющие неприятный запах амины – кадаверин и путресцин, ранее иногда называвшиеся трупными ядами, которые образуются в ходе вызываемых бактериями процессов брожения и гниения белков (в толстом отделе кишечника млекопитающих, а также при гнилостном разложении трупов).

Кадаверин образуется при декарбоксилировании лизина:



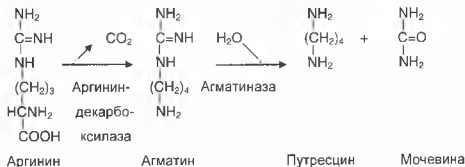
Образование путресцина возможно двумя путями.

По первому пути, выявленному как у бактерий, так и в тканях млекопитающих, образование путресцина катализируется орнитиндекарбоксилазой, осуществляющей декарбоксилирование орнитина:



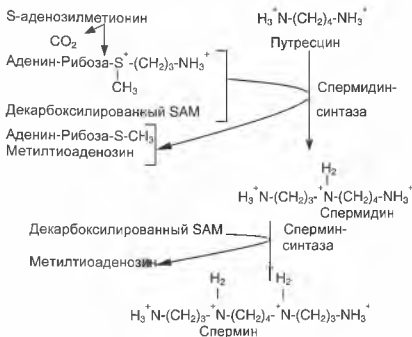
Орнитиндекарбоксилаза является ферментом, определяющим скорость биосинтеза (с участием путресцина) других полиаминов – спермидина и спермина, которые оказывают ингибирующее действие на активность данного фермента по механизму обратной связи.

По второму пути, выявленному у бактерий, в частности у *E. coli*, путресцин образуется при декарбоксилировании аргинина, с последующим гидролизом продукта реакции – агматина на путресцин и мочевины:



Путресцин ускоряет рост клеток как животных, так и бактерий и стимулирует синтез РНК; он присутствует во всех клетках, и все клетки способны превращать путресцин в спермидин – путем декарбоксилирования S-аденозилметионина (SAM) и переноса остатка аминокислоты –CH₂-CH₂-CH₂-NH₂, то есть углеродной цепи метионина

(включая аминогруппу), на путресцин. Перенос такой же молекулы аминопропана на спермидин ведет к синтезу **спермина**:



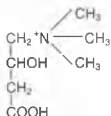
Спермин обнаружен только у зукариотов; Левенгук (1678) наблюдал в микроскоп кристаллы его фосфорнокислой соли в составе спермы человека.

Спермидин и спермин содержатся в клетках всех органов и локализованы главным образом в ядре, где входят в состав хроматина; своими поликатионами они могут, наряду с гистонами и другими белками, стабилизировать суперспиральную структуру ДНК (через отрицательно заряженные фосфатные группы ДНК). У Т-четных фагов (T2, T4, T6), инфицирующих бактерии *E. coli*, до 30% отрицательно заряженных групп ДНК связаны со спермидином и путресцином.

Концентрация спермидина и спермина у млекопитающих увеличивается в тканях в период активного деления клеток и роста тканей, когда они участвуют в регуляции синтеза нуклеиновых кислот и белка. При последующих процессах метаболизма полиаминоксидаза пероксисом печени окисляет спермин в спермидин и далее спермидин в путресцин с превращением диаминопропановых фрагментов в β-

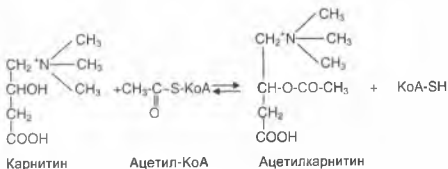
аминопропионовый альдегид. Путресцин и спермидин преимущественно выделяются с мочой в форме ацетильных производных, а часть образующегося путресцина окисляется до NH_4^+ и CO_2 по еще не выясненному механизму.

Карнитин (β -окси- γ -триметиламинобутират)



Карнитин содержится во всех тканях, участвуя в переносе жирных кислот внутрь митохондрий и тем самым способствуя окислению в них жирных кислот.

В присутствии АТФ, ацетилкоэнзима А и фермента трансферазы карнитин может ацетилироваться – путем переноса ацетильной группы с ацетил-КоА на карнитин:



Эта реакция обратима и катализируется цитоплазматической (прямая реакция) и митохондриальной (обратная реакция) карнитин-ацетилтрансферазами.

Наличие в карнитине OH- и CH₃-групп повышает его реактивность, при этом создаются условия для переноса ацетильной группы.

С карнитином реагирует не только ацетил-КоА, но и любой ацил-КоА, то есть возможны и другие ацильные (а не только ацетильные) переносы. Свободные же жирные кислоты внутрь митохондрий через их мембраны не проникают.

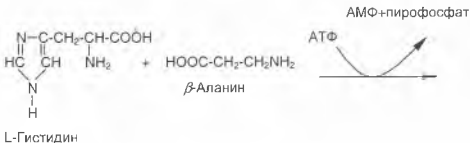
Пептиды, синтезируемые без участия мРНК и системы трансляции

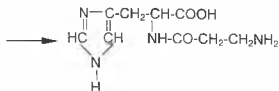
В настоящее время известны пептиды, синтезируемые без участия системы трансляции (то есть по нематричному механизму) как микроорганизмами (циклопептидные антибиотики: грамицидин S, тироцидины А, В, С, D, циклоспорин), так и в тканях животных и человека (карнозин, ансерин, глутатион, офтальмовая кислота). Такие пептиды выглядят, как правило, «аномальными» при сравнении с пептидами, синтезируемыми по матричному механизму [4].

В частности, в синтезе «аномальных» пептидов могут участвовать никогда не входящие в состав белков аминокислоты (β -аланин – в карнозине и ансерине, α -аминомасляная кислота – в офтальмовой кислоте и антибиотиках, орнитин и D-аминокислоты – в антибиотиках). Кроме того, в этих пептидах возможно наличие связей, не встречающихся в белках (например, участие γ -карбоксильной группы глутамата в образовании пептидной связи с цистеином – в глутатионе или с α -аминомасляной кислотой – в офтальмовой кислоте).

Карнозин и **ансерин** являются дипептидами, состоящими из гистидина и β -аланина; они специфичны для скелетной мускулатуры позвоночных.

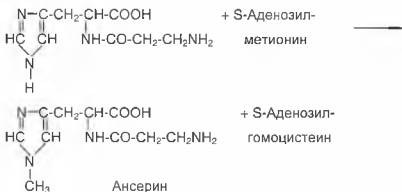
Образование **карнозина** катализируется карнозинсинтетазой:



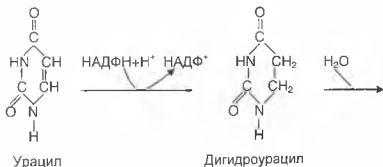


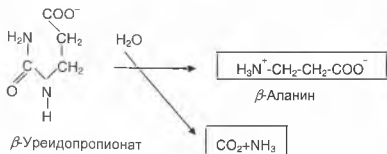
Карнозин (β -аланил-L-гистидин)

Ансерин образуется из карнозина в результате реакции, катализируемой N-метилтрансферазой. В этой реакции донором метильной группы служит S-аденозилметионин:



Ансерин в мышцах человека отсутствует; он характерен преимущественно для быстро сокращающихся скелетных мышц (конечностей кролика, грудной мышцы птиц). Входящий в состав карнозина и ансерина β -аланин в тканях млекопитающих образуется главным образом в результате метаболизма урацила, а также при катаболизме карнозина и ансерина:

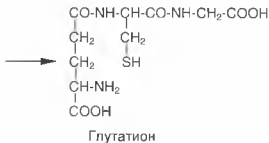
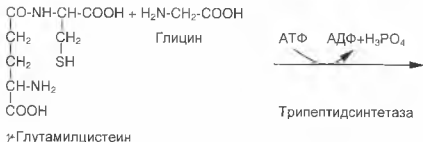
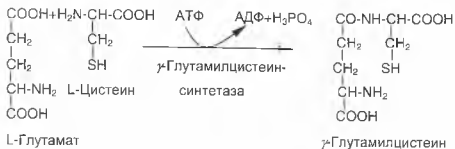




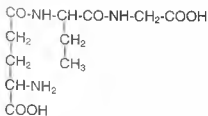
Карнозин и ансерин появляются в строго определенные периоды онтогенеза. В частности, у птиц и кроликов в эмбриональный период в мышечной ткани много свободных аминокислот и появляется карнозин; в постэмбриональный период начинается образование ансерина, сопровождающееся снижением количества карнозина и свободных аминокислот. У взрослых животных и птиц свободного β -аланина в организме нет.

Появление карнозина и ансерина в онтогенезе совпадает с началом функционирования в мышечной клетке ионных каналов, эффективность работы которых они повышают. Возможно, что карнозин и ансерин выполняют в мышцах и буферные функции, поддерживая pH в сокращающихся в анаэробных условиях скелетных мышцах. Кроме того, карнозин и ансерин могут подвергаться фосфорилированию и в виде фосфата вовлекаться в энергетический обмен (повышая содержание в мышцах креатинфосфата и АТФ), а также служить в качестве антиоксидантов, препятствуя накоплению и устраняя продукты перекисного окисления липидов (путем нейтрализации гидроксил-радикалов).

В синтезе глутатиона и офтальмовой кислоты участвуют два фермента (γ -глутамилцистеинсинтетаза и трипептидсинтетаза) и АТФ:



γ -Глутамилцистеинсинтетаза высокоспецифична по отношению к L-глутамату, но вместо цистеина может присоединять к глутамату α -аминомасляную кислоту с образованием (при участии АТФ) дипептида – α -глутамил- γ -бутирилфосфата, который связывается с трипептидсинтетазой. После этого происходит присоединение к дипептиду глицина, завершающее образование офтальмовой кислоты (впервые выделенной из хрусталика глаза):



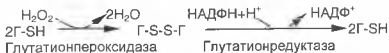
Офтальмовая кислота

Реакции синтеза глутатиона и офтальмовой кислоты отличаются от реакций, ведущих к образованию пептидной связи на рибосомах, способом использования АТФ и обратимостью. Обратимостью действия обладает трипептидсинтетеза, которая в определенных условиях катализирует гидролиз трипептида на дипептид и глицин.

Глутатион обнаружен у всех видов животных, а также в некоторых растениях и бактериях.

Глутатион является важнейшим компонентом антиоксидантной системы организма животных, выполняя роль донора электронов и протонов для предотвращения перекисного окисления липидов; для восстановления пероксида водорода (в молекулы воды) и дегидроаскорбиновой кислоты (в аскорбиновую); для поддержания восстановленного состояния железа (Fe^{2+}) в гемоглобине; для сохранения в активной восстановленной форме SH-групп в белках, в том числе мембранных, и в ферментах (содержащих цистеин в активном центре); для разрыва дисульфидных связей между полипептидными цепями инсулина (при его инаktivации). Кроме того, глутатион участвует в транспорте аминокислот через клеточные мембраны.

Отдавая атомы водорода другим соединениям, восстановленная форма глутатиона ($\Gamma\text{-SH}$) превращается в окисленную ($\Gamma\text{-S-S-}\Gamma$). Необходимый уровень $\Gamma\text{-SH}$ в тканях обеспечивается главным образом благодаря его непрерывному синтезу с участием АТФ, γ -глутамилцистеинсинтетезы и трипептидсинтетезы. Поддержанию оптимального уровня $\Gamma\text{-SH}$ способствуют также реакции, катализируемые глутатионпероксидазой и глутатионредуктазой:

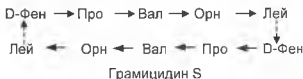


В клетках млекопитающих примерно 90% небелковых тиольных соединений находятся в виде восстановленного глутатиона.

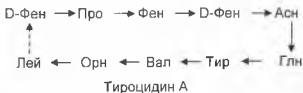
Офтальмовая кислота, отличающаяся от структуры глутатиона лишь наличием CH_3 -группы вместо SH-группы, является антагонистом глутатиона, ингибируя процессы, идущие с участием восстановленного глутатиона.

Антибиотики грамицидин S и тироцидины A, B, C, D, являющиеся декапептидами, синтезируются различными штаммами *Bacillus brevis* по нематричному механизму, в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} . Особенностью их структуры является наличие орнитина и D-аминокислот, не входящих в состав белков.

Синтез **грамицидина S** происходит с участием мультиферментных комплексов, последовательно присоединяющих по пять остатков аминокислот из предварительно образующихся аминокислациладенилатов (аминокислота-АМФ). Два симметрично синтезированных пентапептида, присоединенные к SH-группам идентичных, рядом расположенных ферментных комплексов, образуют циклический декапептид путем замыкания цепей двумя пептидными связями по типу «голова» к «хвосту» (между L-лейцином и D-фенилаланином):



Тироцидины синтезируются на одном мультиферментном комплексе в виде декапептида. Их циклизация происходит за счет образования одной пептидной связи (между концевыми L-лейцином и D-фенилаланином):



Тироцидин B отличается от тироцидина A по одному, тироцидин C – по двум, тироцидин D – по трем аминокислотным остаткам.

Оксид азота (NO) образуется в головном мозге, эндотелии сосудов, фагоцитах и многих других клетках из аминокислоты аргинина при участии **NO-синтазы**:



NO образуется также при расщеплении нитроглицерина.

Оксид азота (оксид азота) вызывает расслабление гладкой мускулатуры сосудов, угнетение агрегации тромбоцитов, различные сдвиги в центральной нервной системе (в том числе изменение секреции гормонов гипоталамуса).

В небольших количествах NO активирует гуанилатциклазу, повышая синтез цГМФ, активирующего протеинкиназы, регулирующего работу мембранных ионных каналов, снижающего концентрацию Ca^{2+} в цитозоле клеток, вызывая тем самым расслабление мышц и расширение сосудов.

Макрофаги, стимулированные бактериальными липополисахаридами или цитокинами (при их контакте с чужеродными агентами), способны синтезировать NO-синтазу и выделять большое количество NO, оказывающего цитостатическое и цитолитическое действие на бактериальные и другие чужеродные клетки (в том числе раковые).

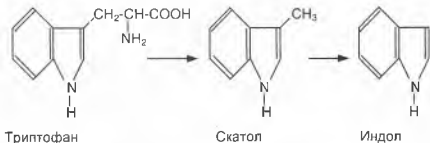
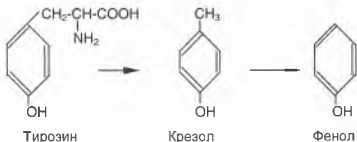
Продукты гниения белков в кишечнике

В желудочно-кишечном тракте процессы гидролиза белков с последующим всасыванием аминокислот происходят при участии не только ферментов пищеварительных желез, но и ферментных систем микроорганизмов. У травоядных микроорганизмы преджелудков и толстого кишечника играют важную роль в пищеварении, в том числе осуществляют синтез незаменимых аминокислот и многих витаминов. Для плотоядных кишечная флора не столь важна как для травоядных, но и у них возможен бактериальный синтез витаминов К и группы В, частично усваиваемых организмом.

Однако микрофлора кишечника человека и животных располагает набором ферментных систем, катализирующих и другие разнообразные превращения пищевых продуктов, в том числе и белков, с образованием не свойственных для процессов пищеварения метаболитов, часть которых является ядовитыми [7].

Превращения пищевых аминокислот, вызываемые деятельностью микроорганизмов кишечника и сопровождающиеся образованием ядовитых веществ (фенола, скатола, аммиака, сероводорода и др.), а также нетоксичных для организма соединений (жирных кислот, окси- и кетокислот, спиртов и др.), получили название «гниение белков в кишечнике».

При бактериальном декарбоксилировании аминокислот образуются CO_2 и амины: путресцин – из орнитина, агматин – из аргинина, кадаверин – из лизина, тирамин – из тирозина, гистамин – из гистидина, триптамин – из триптофана, 5-окситриптамин (серотонин) – из 5-окситриптофана, дофамин – из 3,4-диоксифенилаланина. Дальнейшее разрушение боковых цепей тирозина, триптофана, фенилаланина ведет к образованию ядовитых продуктов – крезола, фенола, скатола, индола, бензойной кислоты.



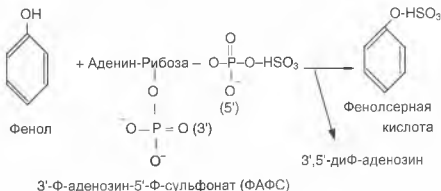
Бензойная кислота в кишечнике травоядных образуется преимущественно за счет освобождения из пищевых растительных продуктов.

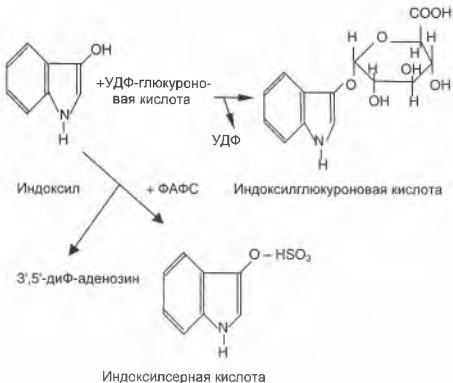
При распаде в кишечнике серосодержащих аминокислот образуются этилмеркаптан ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-SH}$), метилмеркаптан ($\text{CH}_3\text{-SH}$), H_2S , CH_4 .

Образующиеся в результате действия микроорганизмов продукты всасываются из кишечника в кровь и через воротную вену попадают в печень, где возможно обезвреживание ядовитых веществ и превращение их в нетоксичные соединения, выделяемые с мочой.

Обезвреживание фенола, крезола, скатола и индола происходит при их взаимодействии с серной и глюкуроновой кислотами. При этом скатол и индол предварительно гидроксилируются, превращаясь в скатоксил и индоксил.

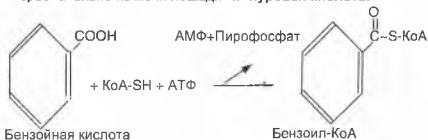
Остаток серной кислоты специфическими трансферазами переносится на гидроксил крезола, фенола, скатоксила и индоксила из ее связанной формы (ФАФС), а остаток глюкуроновой – из УДФ-глюкуроновой кислоты с образованием нетоксичных парных кислот (фенолсерной, фенолглюкуроновой, скатоксилсерной, скатоксилглюкуроновой и др.). Например:

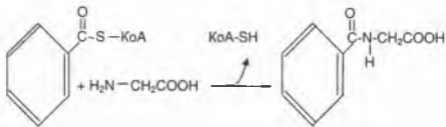




Калиевую соль индоксилсерной кислоты называют животным индиканом; его выделение из организма с мочой повышается при непроходимости кишечника, усилении в нем гнилостных процессов. Определение индикана в моче используют также для оценки функционального состояния печени.

Бензойная кислота нейтрализуется в печени путем реакции присоединения глицина, в результате которой образуется выделенная первоначально из мочи лошади **гиппуровая кислота**:





Бензоил-КоА

Гиппуровая кислота
(N-бензоилглицин)

У травоядных за сутки выделяется с мочой наибольшее количество гиппуровой кислоты (у лошади – 160 г, у коровы – 150 г, у свцы – 30 г), у плотоядных – небольшое (у собаки – 0,05-0,20 г), у человека – около 0,7 г. У человека выделение гиппуровой кислоты повышается при употреблении преимущественно растительной пищи.

Образующийся в кишечнике аммиак после всасывания в кровь может быть использован в печени для синтеза мочевины.

8.10. Алкалоиды, их роль у растений и значение в медицине

Алкалоиды – азотсодержащие органические гетероциклические соединения основного характера, чаще растительного происхождения, обладающие выраженной физиологической активностью. Азот в молекулах алкалоидов содержится в составе циклов. Являясь основаниями, алкалоиды дают соли с кислотами и в большинстве случаев в растениях содержатся в виде солей лимонной, яблочной, щавелевой, янтарной, винной и других кислот в количестве от тысячных долей до 1-2% от массы высушенного растения. Алкалоиды практически не растворимы в воде, но растворимы в органических растворителях (бензоле, хлороформе, эфире); их соли, напротив, хорошо растворимы в воде и нерастворимы в органических растворителях.

Первый алкалоид **морфин** был выделен в 1806 г. из опия. К настоящему времени известно более 5000 алкалоидов. Простейшие алкалоиды имеют менее 20, наиболее сложные – более 50 атомов углерода.

В состав многих алкалоидов кроме углерода, водорода и азота входит кислород в различных группах (гидроксильных, эфирных, карбонильных и др.).

Многие алкалоиды (морфин, хинин, папаверин, атропин, кодеин, стрихнин и др.) используются в качестве лекарственных средств. Некоторые из них обладают избирательным специфическим действием на те или иные ткани (стрихнин и кофеин возбуждают центральную нервную систему, морфин и скополамин – угнетают ее; алкалоиды спорыньи стимулируют мускулатуру матки). При определенных условиях, например при бесконтрольном приеме лекарственных средств, содержащих алкалоиды, они способны вызвать тяжелые отравления.

В организме животных встречаются вещества, по структуре и механизму действия сходные с растительными алкалоидами (ксантин, адреналин, никотиновая кислота и др.). Некоторые алкалоиды получены синтетически (кодеин, лобелин, пилокарпин, кофеин, кокаин, папаверин и др.).

По структуре алкалоиды весьма разнообразны, что затрудняет их классификацию. Основным признаком при классификации алкалоидов принято считать строение азотсодержащей части их молекул. Вещества неустановленного строения классифицируют по филогенетическому признаку, объединяя в одну группу все алкалоиды, выделенные из близких растений. Классификация по ботаническому признаку иногда используется и в отношении алкалоидов с выясненной структурой (алкалоиды спорыньи, пасленовых, коки, опия и т.д.).

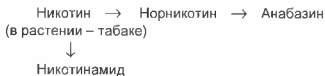
В медицине и ветеринарии используют также деление алкалоидов на группы по их действию на организм человека и животных, при их применении в качестве лечебных препаратов:

- возбуждающие организм в целом (кофеин, лобелин, стрихнин);
- наркотические и успокаивающие средства (морфин, скополамин);
- воздействующие на секреторную и моторную функции желудочно-кишечного тракта (атропин, пилокарпин);
- рвотные (алкалоиды чемерицы);
- противопаразитарные средства (анабазин, ареколин) и т.д.

Происхождение, роль и функции алкалоидов в растениях до конца не выяснены, возможно для различных алкалоидов они различны [8].

Было высказано предположение, что некоторые алкалоиды образуются в результате превращения аминокислот (например, предшественниками морфина являются тирозин и метионин, гордеина – тирозин). В алкалоиды спорыньи входят полипептиды и пируват, что указывает на прямую связь обмена белков и углеводов с образова-

нием алкалоидов. Алкалоиды могут быть промежуточными продуктами или участниками биологического синтеза. Например, алкалоид ячменя гордеин появляется в молодом растении, а по мере развития и созревания растений постепенно исчезает, превращаясь в лигнин (у зрелых растений), то есть тирозин → гордеин → лигнин. Никотин может быть предшественником нескольких продуктов:



Никотин отсутствует в семенах табака и начинает образовываться уже на первых этапах прорастания семян. При созревании семян и накоплении в них белков содержание никотина постепенно снижается.

Возможно участие алкалоидов в окислительно-восстановительных реакциях. Например, платифиллин в некоторых растениях содержится как в восстановленной форме с трехвалентным азотом ($\equiv\text{N}$), так и в окисленной – в виде так называемых N-оксидов, в которых азот пятивалентен и связан с атомом кислорода ($\equiv\text{N}=\text{O}$). N-оксидные формы алкалоидов могут легко отдавать свой кислород, окисляя при этом различные соединения – гидрохинсон, аскорбиновую и лимонную кислоты и т.д. Следовательно, алкалоиды могут играть определенную роль в обмене веществ.

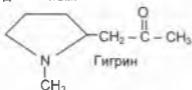
Наконец, некоторые алкалоиды (обладая горьким вкусом или вызывая отравление) возможно выполняют защитные функции (охраняя растения от повреждения насекомыми или поедания травоядными), другие могут быть отбросами жизнедеятельности растений, а третьи – откладываться в корневищах и плодах как запасные вещества для последующего роста и развития растений.

Распространенность алкалоидов в различных семействах растений неодинакова: в одних семействах большая часть видов содержит алкалоиды (маковые, пасленовые, магнолиевые и др.), в других семействах алкалоидоносцы пока не обнаружены.

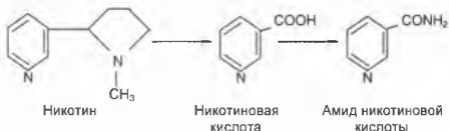
Ниже рассмотрены основные группы алкалоидов (по структуре азотсодержащих циклов).

Производные пиридина, пиперидина и пирролидина

Гигрин – производное пирролидина, выделен из листьев растения *Erythroxylon coca* (Южная Америка), обладает общим стимулирующим действием.



Никотин. В нем соединены друг с другом пиридин и пирролидин. В листьях табака содержится до 8% никотина. Систематическое вдыхание при курении ведет к никотинизму – одной из форм токсикомании. Никотин используется для синтеза никотиновой кислоты и ее амида:



Никотиновая кислота и ее амид содержатся в овощах, фруктах, гречневой крупе, дрожжах, в молоке, в органах и тканях животных (печени, почках, мышцах и др.), входя в состав коферментов (НАД и НАДФ) в дегидрогеназах.

К этой группе относятся также **анабазин** – найден в ежовнике безлистном (Средняя Азия), в малых дозах предложен в качестве средства, облегчающего отвыкание от курения; **лобелин** – в растении *Lobelia inflata* (Северная Америка), возбуждает дыхательный центр и блуждающий нерв; **ареколин** – из арековой пальмы, в ветеринарии применяется как глистогонное средство.

Производные тропана

Тропан представляет собой конденсированное бициклическое соединение из пирролидинового и пиперидинового колец. Его производными являются атропин, содержащийся в различных растениях

семейства пасленовых (красавке, беладонне, белене, дурмане), и кокаин – алкалоид южноамериканского растения (кустарника) *Erythroxylon coca*.

Атропин способен связываться с М-холинорецепторами, блокируя их и препятствуя тем самым проявлению действия ацетилхолина (то есть является его антагонистом). Применяют атропин в глазной практике – для расширения зрачка, при спазмах кишечника и мочевых путей, бронхиальной астме и др.

Кокаин – первое природное соединение, у которого обнаружена местноанестезирующая активность; он оказывает выраженное влияние и на центральную нервную систему, в том числе может вызвать эйфорию.

Производные пурина

К ним относятся алкалоиды листьев чая и семян кофе **кофеин** (1,3,7-триметилксантин) и **теофиллин** (1,3-диметилксантин), а также алкалоид семян какао **теобромин** (3,7-диметилксантин). Кофеин возбуждает центральную нервную систему и стимулирует работу сердца. Общестимулирующее действие теофиллина и теобромина выражено меньше, но они обладают более сильным мочегонным действием, а теофиллин, кроме того, еще бронхорасширяющим эффектом. В механизме действия теофиллина и других метилксантинов играет определенную роль ингибирование фосфодиэстеразы (и как следствие – накопление в тканях цАМФ), а также их способность блокировать аденозиновые (пуриновые) рецепторы в периферических органах, сердечной мышце, бронхах, в центральной нервной системе.

Производные индола

Индольное кольцо входит в состав многих алкалоидов, в том числе **стрихнина** – алкалоида из семян тропического растения чилибуха – *Strychnos nux vomica* (Азия и Африка), **резерпина** – из растения раувольфии (Индия, Шри-Ланка, Ява и др.), **алкалоидов спорыньи** (эрготамина, эрготоксина, эргокрстина, эргокриптина, эргометрина и др.).

Стрихнин в малых дозах действует возбуждающе и применяется как тонизирующее средство, блокируя действие тормозных аминокислотных медиаторов, главным образом глицина.

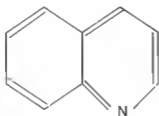
К алкалоидам ряда стрихнина генетически близки алкалоиды, называемые **кураре**, получаемые из различных растений Южной Аме-

рики, в том числе из коры *Strychnos toxifera*. По фармакологическим свойствам кураре относят к группе мускульных релаксантов: парализуют окончания двигательных нервов, но не препятствуют передаче возбуждения, то есть вызывают потерю движений без потери чувствительности. Большие дозы кураре вызывают смерть в результате паралича дыхательных мышц.

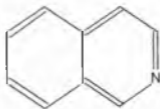
Резерпин обладает выраженным гипотензивным (понижающим кровяное давление) действием, ускоряя высвобождение катехоламинов из гранулярных депо пресинаптических нервных окончаний и их инактивацию (моноаминоксидазой), что ведет к уменьшению выхода катехоламинов в синаптическую щель и ослаблению их влияния на адренорецепторы кровеносных сосудов.

Спорынья – маточные рожки (*Secale comutum*), являющиеся покоящейся стадией одного из грибов семейства спорыньевых, паразитирующего на злаках, преимущественно на ржи. Ее алкалоиды являются производными лизергиновой кислоты – амидами (эргометрин и др.) или представляют собой лизергиновую кислоту в комплексе с полипептидами (эрготамин и др.), при гидролизе которых обнаруживают аминокислоты пролин, фенилаланин, лейцин, валин, а также пируват, диметилпируват, аммиак. Все алкалоиды спорыньи оказывают стимулирующее влияние на мускулатуру матки (более выраженное у эргометрина и эрготамина), а также способны блокировать α -адренорецепторы, конкурируя за них с норадреналином и дофамином (особенно дигидроэрготоксин и дигидроэрготамин), вызывая тем самым расширение кровеносных сосудов и снижение артериального давления.

Производные хинолина и изохинолина



Хинолин



Изохинолин

Производным хинолина является **хинин** – алкалоид хинного дерева, обладающий противомаларийным действием.

Морфин, кодеин, папаверин – производные изохинолина, выделенные из опия – млечного сока незрелых коробочек снотворного мака. Широко применяемый наркотик **героин** представляет собой дважды метилированный морфин.

Морфин – мощное обезболивающее средство. **Кодеин** по характеру действия близок к морфину, обладая по сравнению с ним более слабым болеутоляющим действием, но более выраженной способностью уменьшать возбудимость кашлевого центра, то есть успокаивать кашель.

Определенная часть молекулы морфина и близких к нему по структуре других экзогенных опиатов (кодеина) и опиоидов (синтетических аналогов опиатов) имеет структурное и конформационное сходство с частью молекул (тирозиновым остатком) эндогенных анальгетических соединений (эндогенных опиатов – эндорфинов и энкефалинов). В связи с этим морфин и другие экзогенные анальгетики (опиаты и опиоиды) при введении в организм взаимодействуют с теми же «опиатными» рецепторами, которые предназначены для связывания энкефалинов и эндорфинов, что и определяет сходство фармакологического действия экзогенных и эндогенных анальгетиков.

Папаверин широко применяют как спазмолитическое средство при спазмах гладких мышц органов брюшной полости (кишечника, желче- и мочевыводящих путей), бронхов, периферических сосудов и сосудов головного мозга. По механизму действия (ингибирование фосфодизстеразы, с накоплением цАМФ) сходен с теofilлином.

ГЛАВА ДЕВЯТАЯ МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ

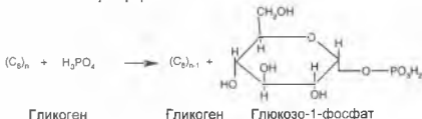
Углеводы – основные соединения, используемые клеткой с целью извлечения энергии. Как уже указывалось выше, их относительно небольшая энергоёмкость с лихвой компенсируется простотой и лёгкостью химических превращений, отсутствием токсических промежуточных продуктов метаболизма. Они могут быть полностью окислены до CO_2 и H_2O , служат основой для синтеза многих других метаболитов, в частности, липидов, энергоёмкость которых в 2 раза выше.

Существенной частью энергетического катаболизма, таким образом, является расщепление углеводов, многие звенья которого тесно связаны с обменом других компонентов метаболизма.

На *подготовительном этапе* осуществляется гидролиз (или фосфороллиз) полисахаридов, олигосахаридов или дисахаридов. Гидролиз осуществляется гликозидгидролазами, важнейшими из которых являются амилаза (α -1,4-гликозидэндогидролаза), мальтаза (α -1,4-гликозидэкзогидролаза), сахараза и другие. Действие их распространяется главным образом на пищеварительный тракт у животных, однако в растительных клетках они осуществляют и внутриклеточный гидролиз углеводов (крахмала, сахарозы, маннанов, ксиланов). В животных клетках запасным углеводом является гликоген, запасаемый рядом клеток (гепатоциты, миоциты, нефроциты), его расщепление представляет собой фосфороллиз.

9.1. Гликогенолиз

Фосфороллиз осуществляется посредством реакции, катализируемой гликогенфосфорилазой:



Фермент специфично катализирует фосфоролитическое расщепление (фосфороллиз) 1,4-гликозидных связей гликогена, продуктом является глюкозо-1-фосфат. Остатки глюкозы отщепляются от концов

молекулы гликогена до тех пор, пока на ветвях не останется примерно 4 остатка глюкозы. Другой фермент, α -1,4 \rightarrow α -1,4-глюкан-трансфераза, переносит трисахаридный фрагмент с одной цепи на другую, открывая 1,6 пункт ветвления. Гидролитическое отщепление по α -1,6-связи осуществляет деветящийся фермент – амило-1,6-глюкозидаза. После удаления ветви на цепь гликогена снова действует фосфорилаза. Глюкозо-1-фосфат изомеризуется с помощью фосфоглюкомутазы в глюкозо-6-фосфат. В клетках печени и почек имеется фермент глюкозо-6-фосфатаза, отщепляющая фосфат от глюкозо-6-фосфата. Образовавшаяся свободная глюкоза тут же удаляется из клеток в кровь. В мышцах данный фермент отсутствует, поэтому миоциты никогда не выводят глюкозу из клеток. Гликогенолиз строго контролируется за счет регуляции активностей двух главных ферментов: гликогенфосфорилазы и гликогенсинтетазы. Механизмы включают аллостерическую и ковалентную модификацию ферментных белков.

Активация и инактивация гликогенфосфорилазы

В клетках печени – гепатоцитах – фосфорилаза находится как в активной, так и в неактивной форме. В активной фосфорилазе (фосфорилаза *a*) гидроксильная группа одного из остатков серина фосфорилирована. Под действием специфической фосфатазы (протеинфосфатаза *I*) фермент превращается в неактивную фосфорилазу *b* в результате гидролитического отщепления фосфата от остатка серина. Реактивация происходит путем фосфорилирования за счет АТФ при действии специфического фермента киназы фосфорилазы.

Фосфорилаза мышечной ткани иммунологически и генетически отличается от фосфорилазы гепатоцитов. Она может находиться в двух формах: фосфорилаза *a* – фосфорилированный фермент, активный вне зависимости от присутствия аллостерического модулятора – АМФ; фосфорилаза *b* – дефосфорилированный фермент, активный только в присутствии АМФ. Активность данной формы также аллостерически ингибируется АТФ, АДФ и глюкозо-6-фосфатом [1].

Механизм активации и инактивации гликогенолиза

В мышцах активация гликогенолиза осуществляется с участием адреналина и ионов Ca^{2+} . Адреналин действует через собственные рецепторы, расположенные в мембранах мышечных волокон (β -адренорецепторы). После образования гормонрецепторного комплекса сигнал передается через ГТФ-зависимые белки (G_s -белки) на

мембранный фермент аденилатциклазу. Активация аденилатциклазы (АЦ) приводит к синтезу из АТФ циклического АМФ:



В гепатоцитах цАМФ синтезируется после формирования гормон-рецепторного комплекса с глюкагоном и активации АЦ (также через G_s -белки). цАМФ является аллостерическим активатором протеинкиназы А (цАМФ-зависимых), ферментов, осуществляющих фосфорилирование киназы фосфорилазы, активируя ее:

Протеинкиназа А

Киназа фосфорилазы + АТФ → Активная киназа фосфорилазы + АДФ

Киназа фосфорилазы активируется также ионами Ca^{2+} и комплексом кальмодулин (кальций связывающий белок, $КМ+Ca^{2+}$). Активная киназа фосфорилазы осуществляет фосфорилирование фосфорилазы *b*, превращая ее в фосфорилазу *a*, отщепляющую от гликогена глюкозо-1-фосфат. Каждый этап регуляторного механизма имеет обратный процесс инактивации: киназа фосфорилазы и фосфорилаза *a* дефосфорилируются протеинфосфатазами I и II; циклический АМФ расщепляется при действии *фосфодистеразы* цАМФ (ФДЭ) (рис. 9.1).



Рис. 9.1. Схема активации процесса гликогенолиза [3]

9.2. Катаболизм моносахаридов

Гликолиз

Гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса) – главный путь метаболизма глюкозы большинства клеток. Глюкоза выбрана в ходе эволюции клетками, вероятно, по причине ее быстрой циклизации в водной среде и, соответственно, снижению химической агрессивности. Гликолиз же, далеко не самый энергетически выгодный процесс, не только остался в эволюции, но и получил удивительно широкое распространение в живых системах, так как чрезвычайно химически прост и имеет весьма выгодное продолжение (рис. 9.2). Как и всякому процессу, гликолизу можно дать четкое определение:

Гликолиз – это окислительное расщепление глюкозы по средней связи до пировиноградной кислоты с одновременным процессом синтеза АТФ путем субстратного фосфорилирования.

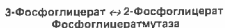


Рис. 9.2. Общая схема пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса

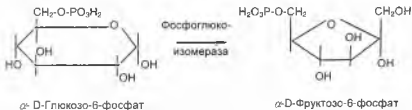
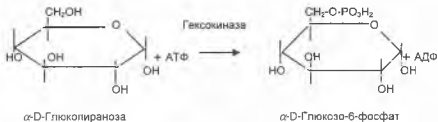
Биохимическая характеристика процесса

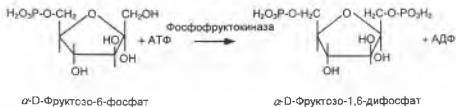
Чтобы разобраться и легко запомнить этот красивый и химически достаточно простой процесс, гликолиз удобно разделить на следующие этапы:

1). Этап подготовки молекулы глюкозы к расщеплению серединной связи. Как уже указывалось выше, молекула глюкозы в циклической форме пиранозного кольца химически достаточно инертна, и прочную серединную связь разорвать без подготовки весьма трудно. Поэтому *три первые реакции представляют собой активацию и подготовку глюкозы к разрыву серединной связи.*

В первой реакции глюкоза фосфорилируется по 6-му атому с использованием молекулы АТФ. Реакция катализируется ферментом гексокиназой или более специфическим ферментом – глюкокиназой (гексокиназа катализирует еще и фосфорилирование других гексоз).

Затем во второй реакции глюкозо-6-фосфат изомеризуется во фруктозо-6-фосфат. Наконец, третья реакция подготовки представляет собой второе фосфорилирование с затратой еще одной молекулы АТФ по первому углеродному атому фруктозы. Это приводит к образованию D-фруктозо-1,6-дифосфата, соединения уже неустойчивого в циклической форме из-за сближения двух отрицательно заряженных фосфатных группировок. Поэтому молекула D-фруктозо-1,6-дифосфата находится большую часть времени в ациклическом состоянии, и отталкивание двух фосфатных групп приводит к растяжению и ослаблению серединной связи. Теперь ее уже легче разорвать. Реакцию второго фосфорилирования катализирует фосфофруктокиназа:

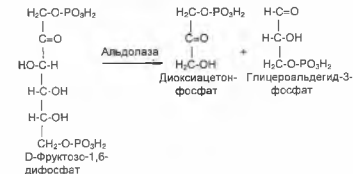




2). Второй этап гликолиза – это этап разрыва серединной связи и установления равновесия между фосфотриозами.

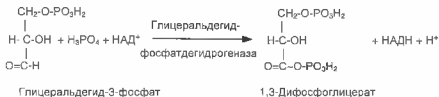
Первая реакция разрыва серединной связи катализируется фруктозо-1,6-фосфатлиазой (альдолаза). В результате образуются две фосфотриозы: глицеральдегид-3-фосфат и диоксиацетонфосфат. Вторая реакция этого этапа катализируется триозофосфатизомеразой, ускоряющей взаимопревращение данных триоз.

В следующий этап гликолиза вступает только глицеральдегид-3-фосфат, а диоксиацетонфосфат постепенно превращается в глицеральдегид-3-фосфат (впрочем, диоксиацетонфосфат выполняет еще очень важную роль, но об этом будет сказано ниже):

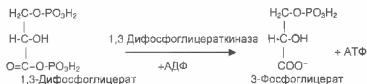


3). Следующая стадия гликолиза – окислительная.

Ведущее значение на этой стадии имеет глицеральдегидфосфат-дегидрогеназная реакция:



Обратите внимание на то, что глицеральдегидфосфатдегидрогеназа – НАД-зависимый фермент, и электроны и протоны с глицеральдегидфосфата переносятся на НАД⁺. Таким образом, для успешного продолжения гликолиза важным будет возможность регенерации НАД⁺, то есть передача полученных электронов и протона на подходящий акцептор. Образующийся в ходе реакции 1,3-дифосфоглицерат представляет собой макроэргическое соединение, имеющее более высокий потенциал переноса фосфатной группы, чем АТФ. В связи с этим становится возможным образование АТФ в процессе субстратного фосфорилирования:

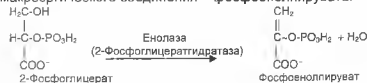


4). Стадия образования пирувата.

3-фосфоглицерат изомеризуется в 2-фосфоглицерат:



Следующая затем реакция очень важна, так как фермент енолаза, осуществляя отщепление воды, приводит к возникновению второго макроэргического соединения – фосфоенолпирувата:



Фосфоенолпируват представляет собой также макроэргическое соединение, обладающее более высоким потенциалом переноса фосфата, чем АТФ, и происходит второе субстратное фосфорилирование:

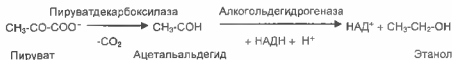


Данная реакция завершает собственно путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса. Однако эти превращения не могут осуществляться длительное время, если не будет возможности отдачи электронов и протонов с восстановленного в глицеральдегидфосфатдегидрогеназной реакции НАД⁺. Поэтому существует несколько путей дальнейших превращений пирувиноградной кислоты, на которых мы остановимся ниже.

Если в клетке осуществляются только анаэробные процессы или имеет место временная нехватка кислорода, быстрое протекание гликолиза обеспечивает передача электронов и протонов на саму пирувиноградную кислоту (ПВК) (молочнокислое брожение):



При спиртовом брожении восстановлению пирувата предшествует декарбоксилирование в уксусный альдегид, который затем восстанавливается в спирт:

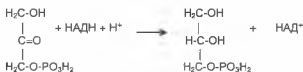


Спиртовое брожение осуществляют ряд бактерий и дрожжевые грибы. Протекает (с небольшой скоростью) данный процесс и в клетках млекопитающих. Есть и другие пути регенерации НАД⁺ при осу-

щественности таких видов брожений, как пропионовокислородное, маслянокислое.

Если же ПВК окисляется дальше до углекислого газа и воды, то электроны и протоны с восстановленного НАД⁺ передаются в дыхательную цепь с помощью **глицеролфосфатного шунтирования**. Именно в этом и заключается еще одна функция диоксиацетонфосфата. С помощью НАД-зависимой глицеролфосфатдегидрогеназы он восстанавливается в глицеролфосфат, при этом происходит регенерация НАД⁺.

Глицеролфосфат легко проникает через митохондриальную мембрану и на наружной стороне внутренней мембраны снова окисляется в диоксиацетонфосфат. Реакция катализируется ФАД-зависимой глицеролфосфатдегидрогеназой, локализованной в мембране, а электроны и протоны передаются в дыхательную цепь переносчиков:



Диоксиацетонфосфат

Глицеролфосфат



Энергетический выход, локализация и регуляция процессов гликолиза

В ходе гликолитического расщепления глюкозы в процессах субстратного фосфорилирования образуется 4 молекулы АТФ на 1 молекулу глюкозы. Кроме этого, если электроны и протоны с восстановленных двух молекул НАД⁺ передаются в дыхательную цепь, то это обеспечивает синтез 6 молекул АТФ. Следовательно, в присутствии O₂ энергетический выход гликолиза составляет 8 молекул АТФ.

Все ферменты, осуществляющие гликолиз (исключая лактатдегидрогеназу, которая, строго говоря, не входит в гликолитический процесс), находятся в примембранных слоях цитозоля и структурно организованы в гликолитический метаболон. Ансамбль ферментов обычно связан с мембраной за счет локализации в ней белка, служащего якорным для адсорбции всех ферментов метаболона. В мышечных клетках в мембранах саркоплазматического ретикулума локализована глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, и на ней крепится

гликолитический метаболон. В других клетках это может быть другой якорный белок [1].

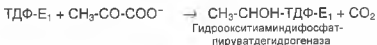
Главной реакцией, лимитирующей скорость гликолитического процесса, является фосфофруктокиназная реакция. Аллостерическим ингибитором фосфофруктокиназы служат АТФ и цитрат. При соединяясь по регуляторному центру, они снижают сродство фермента к фруктозо-6-фосфату.

Второй лимитирующей стадией гликолиза является пируваткиназная реакция. Аллостерическим активатором этого фермента служит АДФ. Таким образом, скорость гликолиза определяется соотношением АТФ/АДФ, а также скоростью дальнейшего окисления пирувата, на начальной стадии которого образуется цитрат. Цитрат легко диффундирует через мембраны митохондрий, и его избыток ингибирует фосфофруктокиназу и гликолиз в целом [3].

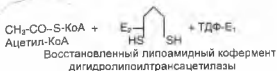
9.3. Пути превращения пировиноградной кислоты

Пируват попадает внутрь митохондрий с помощью транспортной системы, обеспечивающей его антипорт с ионами OH^- . В матриксе митохондрий пируват подвергается окислительному декарбоксилированию в пируватдегидрогеназном комплексе и превращается в ацетил-КоА. Пируватдегидрогеназный метаболон состоит из нескольких полипептидных цепей пируватдегидрогеназы, дегидролипоилтрансацилазы и дегидролипоилдегидрогеназы.

Первая стадия превращения пирувата – окислительное декарбоксилирование, которое осуществляется пируватдегидрогеназой. Коферментом служит тиаминдифосфат (ТДФ):



Затем с помощью дигидролипоилтрансацилазы (E_2) происходит перенос гидрооксигруппы на КоА:



Восстановленный липоамидный кофермент вновь окисляется, передавая электроны и протоны сначала на ФАД-зависимый фермент, а затем на НАД⁺.

Цикл трикарбоновых кислот

Ацетил-КоА далее подвергается превращению в матриксе митохондрий в цикле трикарбоновых кислот (цикл Кребса, ЦТК).

Полное химическое описание превращений органических кислот в цикле было сделано в 1937 году Кребсом и Джонсоном.

Цикл трикарбоновых кислот представляет собой процессы окисления до углекислого газа ацетил-КоА, процесса субстратного фосфорилирования и генерации восстановленных эквивалентов в виде 3 молекул НАДН + 3Н⁺ и одной молекулы ФАДН₂ (рис. 9.3).

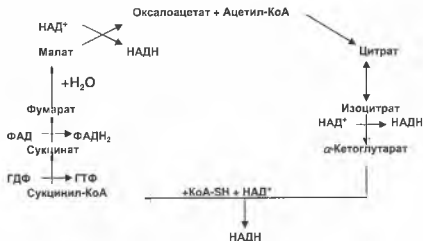
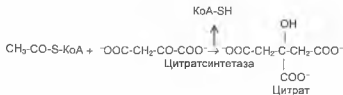


Рис. 9.3. Общая схема цикла трикарбоновых кислот

Окисление химически устойчивой двухуглеродной ацетильной группировки весьма затруднено. Для эффективного окисления ацетильных групп природой было найдено оригинальное решение: замыкание процесса в каталитический цикл. Так как прямое расщепление связи затруднено, то возможно создание крупного органического соединения, перемещение разрываемой связи в β-положение с последующим окислительным распадом ее. Таким образом, ацетил-КоА, окисляемый в цикле, может быть назван первичным субстратом, присоединяемое же к нему соединение – регенерирующим субстратом (так как оно образуется вновь). Разобьем цикл трикарбоновых

кислот на стадии, которые позволят лучше понять его смысл и запомнить.

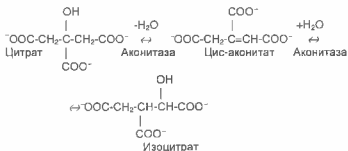
1. Альдольная конденсация первичного субстрата с регенерирующим субстратом. На этой стадии ацетил-КоА конденсируется с оксалоацетатом с образованием трикарбоновой кислоты – цитрата:



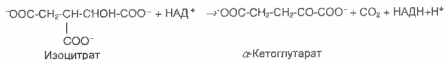
Реакция необратима, катализируется цитратсинтетазой, $\Delta G^0 = 32$ кДж/моль.

2. Окисление ацетильной группы. На этом этапе в ряде реакций с участием НАД-зависимых дегидрогеназ происходят окислительное расщепление ацетила и выделение обоих атомов углерода в виде двух молекул углекислого газа.

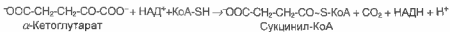
а). Сначала химический смысл имеет перемещение расщепляемой связи в β -положение, поэтому цитрат превращается в изоцитрат через образование цис-аконитата:



б). Окислительное декарбоксилирование изоцитрата. Реакция катализируется НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназой:



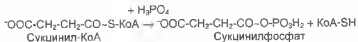
в). Окислительное декарбоксилирование α -кетоглутарата. Реакция катализируется НАД-зависимой α -кетоглутаратдегидрогеназой:



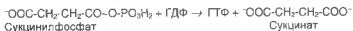
Подобно пируватдегидрогеназному комплексу, α -кетоглутаратдегидрогеназа также представляет собой сложный ферментативный комплекс, катализирующий образование макроэргического соединения – сукцинил-КоА. Его гидролиз сопряжен с синтезом молекулы ГТФ.

г). Сопряжение гидролиза сукцинил-КоА с синтезом ГТФ. Фермент, катализирующий данную реакцию, получил название сукцинил-КоА-синтетазы (хотя обратная реакция в клетках не протекает). Реакция протекает в 2 этапа.

Сначала происходит фосфорилирование тиозфирной связи:

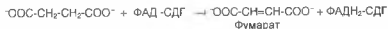


Затем осуществляется перенос фосфата на ГДФ:

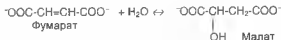


3. Регенерация оксалоацетата

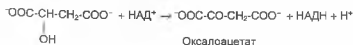
На данном этапе через ряд химических превращений вновь образуется оксалоацетат. Сначала происходит окисление сукцината в фумарат с помощью ФАД-зависимой сукцинатдегидрогеназы (ФАД-СДГ):



Затем фумараза превращает фумаровую кислоту (фумарат) в яблочную (малат):



И наконец, яблочная кислота окисляется в оксалоацетат с помощью НАД-зависимой малатдегидрогеназы:



Образованием регенерирующего субстрата – оксалоацетата – цикл завершается.

9.4. Энергетический выход и регуляция цикла трикарбоновых кислот. Сопряжение с процессом гликолиза

Еще раз внимательно рассмотрим этот замечательный в химическом отношении процесс. Итак, разрыв и химическое окисление двухуглеродного соединения в цикле сопровождается восстановлением 3 молекул НАД⁺ и 1 молекулы ФАД (в составе СДГ). Электроны и протоны с восстановленных эквивалентов передаются в дыхательную цепь и используются в процессе окислительного фосфорилирования. Каждая молекула восстановленного НАД⁺ обеспечивает синтез трех молекул АТФ, ФАД – двух молекул АТФ. Кроме того, одна молекула ГТФ образуется в самом цикле. Проведем несложный подсчет, умножив общий выход еще на два (так как образуются две молекулы пировиноградной кислоты на одну молекулу глюкозы), прибавим выход АТФ из гликолиза и получим выход АТФ при окислении одной молекулы глюкозы до СО₂ и Н₂О: 38 молекул АТФ (см. ниже схему).

Основные ферменты, катализирующие реакции цикла, локализованы в матриксе митохондрий, кроме сукцинатдегидрогеназы, адсорбированной на внутренней мембране митохондрий. Однако имеются сведения о том, что ферменты цикла также организованы в метаболон и ассоциированы с СДГ [1].

Схема подсчета энергетического выхода окисления одной молекулы глюкозы

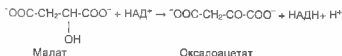
Процесс	Реакция	Восстановленные эквиваленты	Количество АТФ
1. Гликолиз	Глицеральдегид-фосфатдегидрогеназная	2 НАДН	6
	Фосфоглицераткиназная		2
	Пируваткиназная		2
			-2 (израсходовано) ИТОГО: 8
2. Образование ацетил-КоА	Пируватдегидрогеназная	2 НАДН	6
3. ЦТК	Изоцитратдегидрогеназная	2 НАДН	6
	α -Кетоглутаратдегидрогеназная	2 НАДН	6
	Сукцинатдегидрогеназная	2 ФАДН ₂	4
	Сукцинил-КоА-синтетазная	2 НАДН	2
	Малатдегидрогеназная		6
		ИТОГО: 30 Всего: 38	

Регуляция скорости цикла осуществляется за счет трех лимитирующих стадий, а также зависит от скорости производства ацетил-КоА в пируватдегидрогеназном комплексе. Вообще следует отметить, что полная цикличность процесса характерна в основном для условий пробирки. В клетке продукт может уйти в другие реакции, а любой субстрат может поступить из реакций вне цикла. Организация процесса в метаболон делает цикличность более вероятной. Но известно, что малат и цитрат способны свободно мигрировать через митохондриальные мембраны в обоих направлениях, а значит уходить из цикла или приходить из цитоплазмы. Как и в других метаболических путях, в ЦТК работает несколько механизмов контроля, причем в различных условиях скорость лимитируется разными стадиями процесса. Главными факторами при этом являются: 1) скорость поступления ацильных групп, которая, в свою очередь, зависит от количества свободного кофермента А; 2) наличие оксалоацетата; 3) скорость реокисления НАДН и ФАДН₂ в дыхательной цепи.

Основными регуляторами, как и в случае гликолиза, служат АТФ и АДФ, точнее, соотношение между ними. Если в ходе катаболизма образуется больше АТФ, чем это необходимо для энергетических затрат клетки, то концентрация АДФ падает до низкого уровня, включая фосфорилирование. В то же время АТФ служит отрицательным эффектором многих аллостерически регулируемых ферментов катаболизма, тогда как АДФ – положительный эффектор. Важным участком регулирования является пируватдегидрогеназный комплекс, активность его контролируется (частично) механизмом фосфорилирования-дефосфорилирования пируватдегидрогеназы. При этом фосфорилирование АТФ-киназой приводит к образованию неактивного фосфофермента. Особая фосфатаза реактивирует фермент, отщепляя фосфат. Другой участок регуляции относится непосредственно к циклу – цитратсинтазная реакция. Отрицательным эффектором цитратсинтазы обычно (в большинстве клеток) является АТФ. АДФ же служит положительным эффектором изоцитратдегидрогеназы, что в результате приводит к снижению концентрации цитрата. Положительными эффекторами изоцитратдегидрогеназной реакции являются также субстраты изоцитрат и НАД⁺, причем между ними и АДФ существует взаимная кооперативность: присоединение АДФ по аллостерическому центру увеличивает скорость присоединения НАД⁺, а это, в свою очередь, повышает скорость присоединения и превращения изоцитрата. Для регуляции имеет значение также реакция окислительного декарбосилирования α -кетоглутарата в сукцинил-КоА. Аллостерическими ингибиторами этого процесса служат продукты реакции: восстановленный НАД⁺ и сукцинил-КоА. Существует также мнение, что регулируется активность каждого фермента цикла и при соответствующих условиях начинает действовать тот или иной механизм регуляции.

Сопряжение процессов катаболизма осуществляется с помощью челночных (шунтирующих) механизмов. Один из них (глицеролфосфатный шунт) мы рассмотрели выше. Рассмотрим еще два наиболее распространенных шунтирующих метаболических процесса: малатно-оксалоацетатный и цитратный. Цитрат легко проникает через митохондриальные мембраны и при его накоплении выходит в цитозоль. Выход цитрата имеет два важных последствия: синтез жирных кислот из цитрата через образование малонил-КоА и ингибирование фосфофруктокиназы. Таким образом, избыток цитрата приводит к ускорению процесса образования жирных кислот и торможению скорости гликолитического процесса.

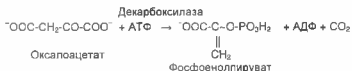
Избыток малата также может поступать в цитозоль или, наоборот, из цитоплазмы в митохондрии. В цитоплазме малат превращается в оксалоацетат под действием НАД-зависимой малатдегидрогеназы:



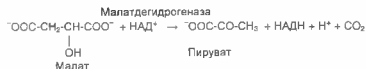
Реакция обратима, образующийся оксалоацетат может, кроме того, превращаться в пируват или в фосфоенолпируват при избытке АТФ, что будет стимулировать процессы глюконеогенеза:



Эта реакция может протекать самопроизвольно, чисто химическим путем, или под действием декарбоксилазы с затратой АТФ оксалоацетат может быть превращен в фосфоенолпируват:



Малат может быть превращен в пируват сразу (минуя оксалоацетат) с помощью НАД- или НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы (МДГ) декарбоксилирующей («яблочный фермент»):



Этот процесс протекает в митохондриях и имеет важное регулирующее значение. НАДФ-зависимый фермент активируется высокими концентрациями свободного КоА, который «включает» процесс окисления малата. Высокие же концентрации НАДН ингибируют фермент. В результате возрастает концентрация оксалоацетата и повышается скорость цитратсинтазной реакции.

9.5. Глюконеогенез. Гликогеногенез

Глюконеогенез включает все механизмы и пути, обеспечивающие образование глюкозы из неуглеводных компонентов. Субстратами для образования глюкозы и затем гликогена служат ряд аминокислот (глюкогенных), лактат и пируват. Этот процесс наиболее активно осуществляется в гепатоцитах и нефроцитах, а также в миоцитах.

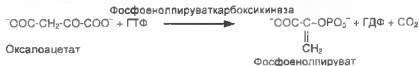
Эти пути во многом являются обратными процессам гликолиза и некоторым реакциям цикла трикарбоновых кислот. Простому обращению процессов препятствует ряд необратимых стадий:

1) превращение фосфоенолпирувата в пируват; 2) превращение фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат; 3) превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат. Эти стадии осуществляются в обратном направлении с помощью специальных реакций.

Переход пирувата в фосфоенолпируват включает 2 стадии. Первая реакция – карбоксилирование пирувата в оксалоацетат – осуществляется ферментом пируваткарбоксилазой при участии биотина в качестве кофермента и АТФ:



Реакция протекает в митохондриях. Вторая реакция – превращение оксалоацетата в фосфоенолпируват – происходит вне митохондрий, в цитоплазме с помощью фермента фосфоенолпируваткарбоксикиназы. Для реакции требуется макроэргическая связь в виде ГТФ или инозитолтрифосфата (ИТФ):



Так как оксалоацетат не проникает через мембраны митохондрий, то переход осуществляется с помощью малатного шунта. Оксалоацетат восстанавливается в малат под действием НАД-зависимой малатдегидрогеназы, легко проходит в цитозоль и здесь снова окисляется в оксалоацетат цитозольной малатдегидрогеназой (НАД-зависимой).

Превращение фруктозо-1,6-дифосфата во фруктозо-6-фосфат осуществляется фруктозо-1,6-дифосфатазой. Наличие этого фермента в клетках определяет их способность к ресинтезу гликогена из пирувата и триозофосфатов. Он обнаруживается в печени, нефроцитах, клетках поперечно-полосатой мышечной ткани.

Превращение глюкозо-6-фосфата в глюкозу катализируется также специфической фосфатазой: глюкозо-6-фосфатазой. Фермент присутствует в гепатоцитах и нефроцитах, но отсутствует в клетках мышечной ткани. Поэтому глюкоза в кровь поставляется только гепатоцитами.

Гликогеногенез. Если распад гликогена осуществляется с помощью гликогенфосфорилазы, то синтез его идет совсем по другому пути и катализируется гликогенсинтетазой.

В покоящейся мышце гликогенсинтетаза активна, тогда как фосфорилаза находится в неактивной форме (фосфорилаза *b*). Активная гликогенсинтетаза использует глюкозо-6-фосфат, который обратимо изомеризуется в глюкозо-1-фосфат специфической изомеразой и УТФ:



Синтез гликогена, так же как и распад, подвергается сложной регуляции. Активная форма гликогенсинтетазы (I-форма) может быть подвергнута фосфорилированию ц-АМФ-зависимой протеинкиназой и перейти в D-форму, активность которой зависит от глюкозо-6-фосфата, аллостерического активатора данного фермента. Дефосфорилирование осуществляется фосфатазой, активность которой повышается в присутствии дериватов (метаболиты) инсулина. Процессы синтеза и распада гликогена взаимосвязаны через механизмы регуляции (рис. 9.4).

Наличие фосфорилазы и гликогенсинтетазы еще недостаточно для синтеза и расщепления гликогена. Синтез гликогена требует создания разветвления участков, образующихся в присутствии ветвящего фермента – амило-1,4- → α-1,6-трансгликозилазы. Расщепление же требует соответственно разрушения точек ветвления. Это сопровождается гидролитическим отщеплением глюкозных единиц, катализируемым амило-1,6-глюкозидазой. Эти ферменты, возможно, также являются объектами регуляции.

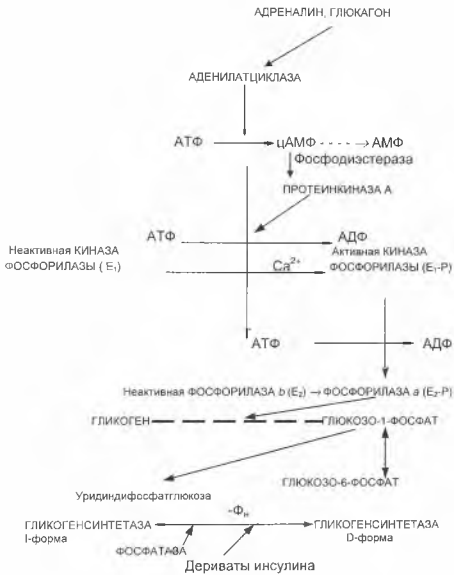


Рис. 9.4. Схема регуляции процессов гликогенолиза и синтеза гликогена [2]

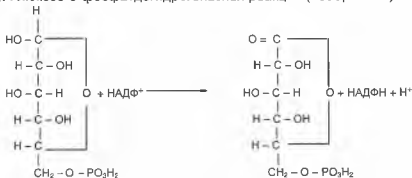
9.6. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы

Метаболические пути, в которых участвуют пятиуглеродные сахара, называют либо пентозофосфатными, либо монофосфатными путями превращения углеводов. Пентозофосфатные пути многообразны и многоплановы, они функционируют как в прямом (окислительном), так и в обратном (восстановительном) направлении. При окислении они предполагают постепенное отщепление от глюкозы по одному атому углерода и его выделение в виде CO_2 , при восстановлении – присоединение CO_2 обычно к пятиуглеродному сахару.

Итак, **окислительный пентозофосфатный путь** окисления глюкозы представляет собой *отщепление от углеродной цепи последовательно по одному атому углерода в форме CO_2* . При этом происходит восстановление НАДФ и, в отличие от гликолиза, отсутствует процесс субстратного фосфорилирования. Ферменты, участвующие в этом процессе (а следовательно, и сам процесс) можно разделить на три различные системы: 1) дегидрогеназно-декарбоксилазную; 2) изомеразную; 3) систему структурной перестройки сахаров.

Дегидрогеназно-декарбоксилазная система ферментов включает три фермента, и, соответственно, осуществляются три реакции. В двух из них происходит восстановление НАДФ:

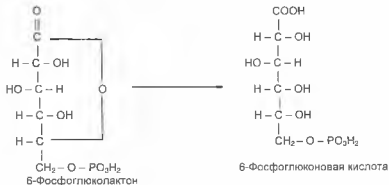
а). Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназная реакция (необратима)



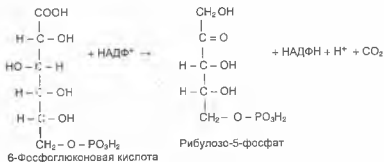
Глюкозо-6-фосфат

6-Фосфоглюколактон

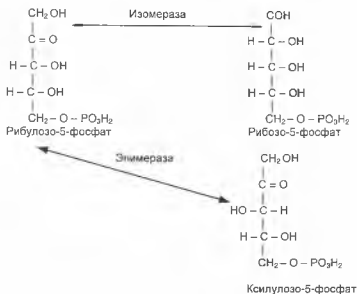
б). Следующая реакция может протекать самопроизвольно, но фермент 6-глюколактоназа существенно ускоряет ее:



в). Следующая реакция представляет собой окислительное декарбоксилирование 6-фосфоглюконовой кислоты в рибулозо-5-фосфат с помощью фермента 6-фосфоглюконатдегидрогеназы:



Изомеризирующая система состоит из двух ферментов, обеспечивающих взаимные превращения трех пентозофосфатов:



Система структурной перестройки сахаров сложна, но можно выделить два главных фермента, а соответственно, и две основополагающие реакции: *транскетолазную* и *трансальдолазную*. Транскетолаза отщепляет от фосфосахаров C_2 -фрагменты и подобно пироватдегидрогеназе имеет тиаминпирофосфат в качестве кофермента. Трансальдолаза отщепляет C_3 -фрагмент. Оба фермента осуществляют такое большое число взаимопревращений моносахаров, что вряд ли кто-то сможет их все удержать в памяти. Приведем лишь некоторые примеры этих реакций (рис. 9.5).

Полное окисление глюкозы до молекул CO_2 по пентозофосфатному пути возможно лишь в том случае, если в клетках присутствуют ферменты, превращающие глицеральдегид-3-фосфат в глюкозо-6-фосфат, то есть ферменты глюконеогенеза.

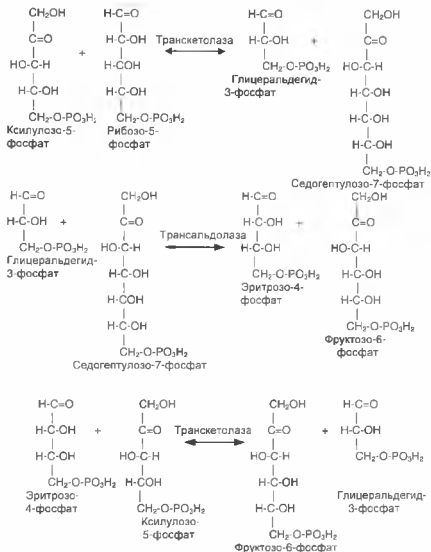


Рис. 9.5. Некоторые реакции структурной перестройки сахаров пентозофосфатного пути окисления глюкозы [3]

Метаболическое значение пентозофосфатного пути состоит, во-первых, в генерации восстановленных эквивалентов в виде НАДФН, который используется в процессах биосинтеза жирных кислот, стероидов, аминокислот. Во-вторых, этот путь приводит к образованию

пентоз, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот. Вероятно, в эволюции изначальный смысл пути – образование пятиуглеродных сахаров. Этапы структурной перестройки сахаров используются в восстановленном пентозофосфатном пути для фиксации CO_2 в процессе фотосинтеза (цикл Кальвина). Значение метаболического пути для различных клеток и тканей неодинаково. Пентозофосфатный путь активно протекает в печени, жировой ткани, коре надпочечников, щитовидной железе, эритроцитах (первые окислительно-восстановительные реакции). Это связано с активностью в этих клетках синтеза жирных кислот, стероидов или процесса восстановления глутатиона в эритроцитах. В скелетной мускулатуре активность пентозофосфатного пути окисления глюкозы невысока.

ГЛАВА ДЕСЯТАЯ МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ

10.1. Биосинтез нуклеотидов

10.1.1. Пути синтеза мононуклеотидов

Почти все организмы (за исключением некоторых видов бактерий) способны синтезировать пиримидиновые и пуриновые нуклеотиды одним и тем же способом из простых соединений, например, из CO_2 , NH_3 , аспартата, глицина, глутамина и рибозы при участии ферментов. На определенных этапах биосинтеза возникают сначала предшественники нуклеотидов, а затем завершается полный синтез готовых продуктов. В природе существуют два отдельных пути – один для пиримидиновых нуклеотидов, другой – для пуриновых.

Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды могут синтезироваться *de novo* (из простых предшественников), а также непосредственно из готовых пуриновых и пиримидиновых оснований и 5-фосфорибозил-1-пирофосфата. Второй путь предназначен для сохранения пула пиримидиновых и пуриновых оснований от их распада. Значение этих двух путей для разных клеток различно. Так, в тканях млекопитающих нуклеотиды преимущественно синтезируются *de novo*, хотя в быстро растущих тканях образуются обоими путями. А для нормального роста и развития многих видов бактерий необходимо наличие в питательной среде готовых молекул пуринов или пиримидинов.

Из трех частей нуклеотида (азотистого основания, пентозы и фосфорной кислоты) только азотистое основание должно синтезироваться специфическим образом, поскольку фосфорная кислота всегда присутствует в клетке, а пентоза образуется в процессе распада углеводов.

Исходные вещества для биосинтеза пуриновых и пиримидиновых оснований в большинстве организмов исключительно доступны или всегда присутствуют в нем (NH_3 , формильная группа и CO_2 образуются в процессе деструкции разнообразных органических соединений или поступают в организм извне, а глутаминовая и аспарагиновая кислоты и их амиды синтезируются в большом количестве).

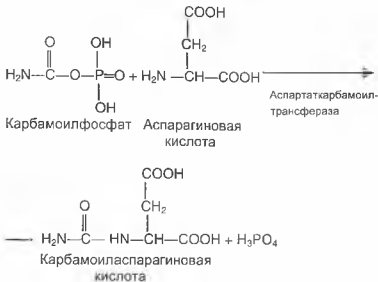
10.1.2. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов

Первым шагом в расшифровке механизма биосинтеза пиримидина было открытие Д. Хеммерстена, который установил, что предшественником пиримидиновых оснований является *оротовая кислота*. В дальнейшем, благодаря работам А. Корнберга и других исследователей, стал известен весь процесс.

Механизм биосинтеза пиримидиновых оснований отличается от биосинтеза пуриновых оснований уже на самом первом этапе. Так, первой реакцией образования пиримидиновых оснований является реакция образования *карбамоилфосфата* из NH_3 и CO_2 , идущая с затратой энергии АТФ:



Карбамоилфосфат вступает в реакцию с *аспарагиновой кислотой* (происходит перенос карбамила на аминогруппу аспарагиновой кислоты) и под действием аспартат-карбамоилтрансферазы превращается в *карбамоиласпартат*:



В молекуле карбамоиласпарагиновой кислоты происходит сближение NH_2 - и COOH -групп, а затем и их взаимодействие с выделением молекул воды. Таким образом, под действием фермента дигидрооротазы происходит циклизация и окисление карбамоиласпарагиновой кислоты, в результате чего образуется *дигидрооротовая кислота*. Затем эта кислота окисляется под действием фермента оротатредуктазы и образуется *оротовая кислота*. Из оротовой кислоты может образовываться *пиримидиновое кольцо* (рис. 10.1).

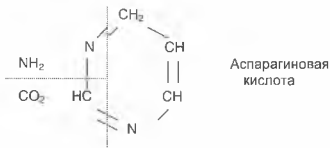


Рис. 10.1. Происхождение атомов пиримидинового кольца

После декарбоксилирования оротовой кислоты образуется одно из пиримидиновых оснований – *урацил*. Но этот процесс имеет место

только после соединения оротовой кислоты с рибозой, то есть образования *нуклеозида оротидина*. Поскольку реакция идет между оротовой кислотой и 5-фосфорибозилпирофосфатом (ФРПФ), то возникает соединение *оротидин-5'-монофосфат* (ОМФ). В дальнейшем оротидин-5'-фосфат декарбоксилируется (при участии фермента оротидин-5'-фосфат-декарбоксилазы) и возникает *уридин-5'-монофосфат* (УМФ) – пиримидиновый нуклеотид (рис. 10.2), занимающий центральное место в биосинтезе пиримидиновых нуклеотидов, так как он может превращаться в другие пиримидиновые нуклеотиды.

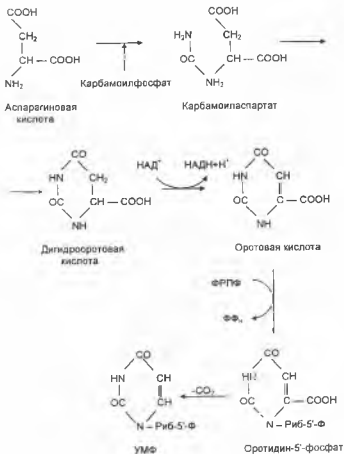


Рис. 10.2. Схема биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов

Превращения пиримидиновых нуклеотидов осуществляются путем реакций восстановления, аминирования и метилирования моно-, ди- и трифосфорных эфиров нуклеозидов.

Химические модификации урацила в цитозин происходят на уровне нуклеозидтрифосфатов и осуществляются под действием фермента *ЦТФ-синтетазы*:



Это уравнение реакций написано в достаточно упрощенном варианте. В действительности *уридилловая кислота* сначала реагирует с *аденозинтрифосфатом* и отнимает от него два фосфатных радикала. Образующийся *уридинтрифосфат* (УТФ) путем реакции с аммиаком превращается в *цитидинтрифосфат* (ЦТФ), который передает свои два фосфатных радикала *аденилловой кислоте*, то есть дефосфорилируется с образованием *цитидилловой кислоты*. Присоединение аммиака является процессом, для осуществления которого необходима энергия (за счет разрыва одной фосфатной связи АТФ). При этом из одного аденозинтрифосфата образуется один аденозиндифосфат [1, 2].

Тиминовые нуклеотиды образуются в результате метилирования дезоксиуридинмонофосфата. Реакция катализируется ферментной системой – *тимидилат-синтазой* (димерный белок, каждая цепь которого состоит из 316 аминокислотных остатков). Процесс очень сложный и протекает в несколько стадий. Источником одноуглеродного фрагмента при пятом углеродном атоме служит кофермент *N⁵N¹⁰-метилентетрагидрофолиевая кислота*.

В реакциях аминирования (превращение УТФ в ЦТФ) источником аминогруппы у млекопитающих служит глутамин, введение аминогруппы которого осуществляется с затратой энергии АТФ.

Для процессов метаболизма пиримидиновых нуклеотидов (впрочем, так же как и аминокислот) характерна регуляция главным образом по механизму обратной связи. Так, скорость биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов регулируется ферментом *аспартаттранскарбамоилазой* (АТКазой, состоящей из 6 каталитических и 6 регуляторных субъединиц), катализирующей первую реакцию биосинтетического пути образования нуклеотидов. Конечные продукты биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов (например, ЦТФ) ингибируют активность АТКазы. В результате этого не происходит формирования пиримидинового цикла. Антагонистом ЦТФ в ингибировании активности АТКазы является АТФ, активирующая данный фермент. Активирова-

ние или ингибирование биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов зависит от соотношения в клетке АТФ и ЦТФ, то есть от энергетического баланса клетки, а также от уровня реакций окислительного фосфорилирования, обеспечивающих синтез АТФ.

10.1.3. Биосинтез пуриновых нуклеотидов

Синтез пуриновых оснований *de novo* из небольших по молекулярной массе предшественников осуществляется в большинстве клеток различных организмов. Этот факт является примером единства ряда основных биохимических процессов всего живого.

Пуриновый путь более сложный, так как требует большего числа исходных соединений и состоит из большего числа стадий. Основания не синтезируются в свободном виде, а пуриновый цикл собирается постепенно путем присоединения необходимых фрагментов к *рибулозо-5-фосфату* (процесс называется *риботилированием*), так что к моменту завершения построения цикла образуется готовый нуклеотид [3, 4].

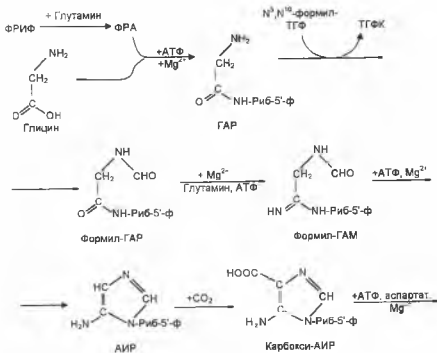
Многочисленные исследования показали, что исходными предшественниками в биосинтезе пурина являются такие соединения, как CO_2 , глицин, аспартат, формиат, глутамин (рис. 10.3).



Рис. 10.3. Происхождение атомов, образующих пуриновое ядро

Цепочку из двух атомов углерода и одного атома азота (С-4, С-5, N-7) дает аминокислота глицин, один атом азота (N-1) поступает из аспартата, оставшиеся два атома азота (N-3 и N-9) дает глутамин, два атома углерода (С-2 и С-8) – муравьиная кислота (формиат).

Образование пуринового кольца идет сразу на D-рибозо-5-фосфате, и уже над ним надстраивается каркас молекулы *гилоксантина*. Таким образом, синтезируется не свободное азотистое основание, а его нуклеотид – *инозиновая кислота* (рис. 10.4).



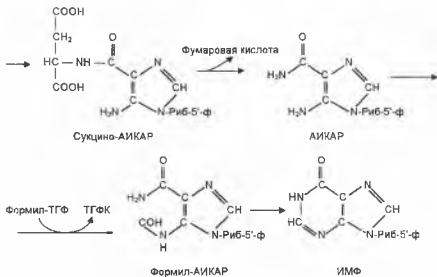


Рис. 10.4. Схема биосинтеза пуриновых нуклеотидов: АИКАР – 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотид, АИР – 5-аминоимидазолрибонуклеотид, ГАР – глицинамидрибонуклеотид, ИМФ – инозин-5'-монофосфат, Риб-5-ф – рибозо-5-фосфат, N^5N^{10} -ТГФ – N-формил-тетрагидрофолиевая кислота, формил-ГАМ – формилглицинамидрибонуклеотид, ФРА – 5-фосфори-бозиламин, ФРПФ – 5-фосфорибозил-1-пирофосфат [2]

Инозиновая кислота служит предшественником всех остальных пуриновых нуклеотидов. Так, адениловая кислота (АМФ) образуется в результате аминирования инозинмонофосфата (ИМФ), аминогруппа поставляется аспарагиновой кислотой. Образование гуаниловой кислоты (ГМФ) из ИМФ является двухстадийной реакцией. Первая стадия состоит в окислении ИМФ до ксантозин-5'-фосфата (КМФ). Затем происходит его аминирование и образуется ГМФ. Донор аминогруппы, по-видимому, различен у ряда организмов: у птиц и млекопитающих донором служит глутамин, в бактериальных клетках – NH_3 .

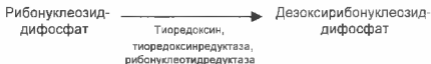
Регуляция общей скорости синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* и относительных скоростей образования двух конечных продуктов, адениловой и гуаниловой кислот, осуществляется при участии трех главных регуляторных механизмов, действующих по типу обратной связи.

Один из этих механизмов контролирует раннюю стадию, свойственную только этому биосинтетическому пути, а именно стадию переноса аминогруппы на 5-фосфорибозил-1-пирофосфат с образованием 5-фосфорибозиламина. Эту реакцию катализирует аллостерический фермент (*амидофосфорибозилтрансфераза*), ингибируемый конечными продуктами данной последовательности реакций АМФ и ГМФ. Поэтому при образовании АМФ и ГМФ в избытке первая стадия их биосинтеза из фосфорибозилпирофосфата тормозится.

Второй регуляторный механизм действует на одной из более поздних стадий. В этом случае избыток ГМФ в клетке вызывает аллостерическое ингибирование процесса образования ГМФ из инозиновой кислоты, но не влияет на синтез АМФ. И наоборот, когда действует третий регуляторный механизм, накопление адениловой кислоты подавляет ее образование, но не затрагивает синтез ГМФ.

10.1.4. Биосинтез дезоксирибонуклеотидов

Строительные блоки ДНК (дезоксирибонуклеотиды) образуются из соответствующих рибонуклеотидов в реакциях восстановления. Восстановление пиримидиновых нуклеотидов происходит по гидроксильной группе при втором углеродном атоме рибозы рибонуклеозиддифосфата. В результате этой реакции остаток рибозы превращается в остаток *дезоксирибозы*. Подобная реакция свойственна только нуклеозиддифосфатам и осуществляется при участии трех белков (тиоредоксина и двух ферментов):



Тиоредоксин представляет собой небольшой белок (примерно 11700 Да), состоящий из одной полипептидной цепи с одной дисульфидной связью. *Тиоредоксинредуктаза* – это фермент, катализирующий НАДФН-зависимое восстановление —S—S— в —SH + HS— с образованием восстановленного тиоредоксина. *Рибонуклеотидредуктаза* – фермент, катализирующий восстановление рибонуклеозида в 2'-дезоксирибонуклеозид, причем восстанавливающим агентом является восстановленный тиоредоксин. В настоящее время обнаружены две различные рибонуклеотидредуктазы: 1) присутствует в

тканях млекопитающих и в *E.coli*, содержит негеминное железо, субстратом для нее являются нуклеотиддифосфаты; 2) представляет собой V_{12} -зависимый фермент и ее субстратами являются нуклеозидтрифосфаты. В качестве донора электронов обе рибонуклеотидредуктазы используют восстановленный тиоредоксин.

Фермент *рибонуклеотидредуктаза* в клетках *E.coli* катализирует восстановление всех четырех рибонуклеозиддифосфатов – АДФ, ГДФ, ЦДФ, УДФ в их дезоксипроизводные дАДФ, дГДФ, дЦДФ, дУДФ.

Метилцитозин и *гидроксиметилцитозин*, являющиеся в некоторых микроорганизмах и фагах составными частями ДНК, образуются путем превращения *цитидиловой кислоты* уже внутри нуклеотида. Образование дезоксицитидиловой кислоты происходит также из готовой цитидиловой кислоты. Сначала идет превращение углеводной части, а затем – азотистого основания.

10.2. Распад пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов

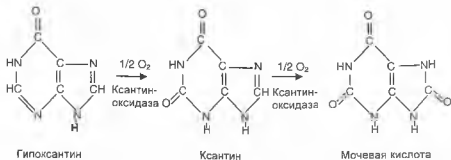
И на РНК, и на ДНК в клетке действуют различные *нуклеазы* (эндо- и экзонуклеазы), в результате чего образуются монофосфонуклеотиды:



Монофосфонуклеотиды могут быть повторно использованы для биосинтеза РНК и ДНК, а также могут быть расщеплены до других продуктов, используемых в других реакциях и процессах [2].

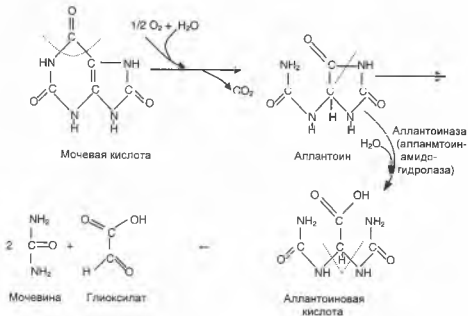
В большинстве организмов первичные процессы расщепления нуклеотидов сходны. Так, первая фаза распада пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов заключается в *дезаминировании* тех из них, которые обладают аминогруппами. Этот процесс катализируется специфическими ферментами – *аминогидролазами*. В результате дезаминирования азотистого основания аденина образуется *гипоксантин*, гуанина – *ксантин*, а цитозина – урацил.

Дальнейшая судьба дезаминированных пуриновых и пиримидиновых оснований различна. Гипоксантин и ксантин окисляются в мочевую кислоту:



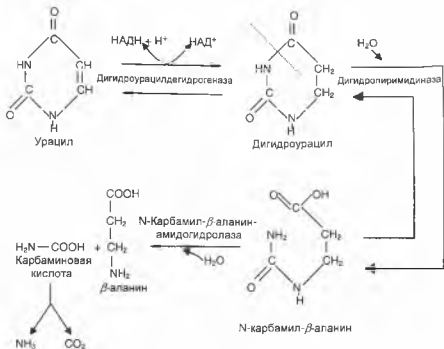
Реакции окисления гипоксантина в ксантин, а ксантина в мочевую кислоту ускоряются специфической оксидоредуктазой – *ксантинооксидазой*. Фермент обладает молекулярной массой от 280 кДа до 360 кДа (в зависимости от организма), состоит из двух идентичных субъединиц, каждая из которых содержит одну молекулу ФАД, один атом молибдена и четыре атома негеминового железа, связанных с лабильными атомами серы. В некоторых растениях ксантин превращается в кофеин, являющийся триметилпроизводным ксантина.

У большинства приматов (в том числе человека), птиц, некоторых рептилий и большинства насекомых ксантин превращается в *мочевую кислоту*, которая в качестве конечного продукта катаболизма пуринов выводится из организма. У остальных наземных животных и растений есть ферменты (ферменты уриколиза) и ферментные системы, способные ускорять реакции дальнейшего распада мочевой кислоты. В одних случаях (млекопитающие, насекомые) уриколиз сводится к окислению мочевой кислоты в *аллантиин*; в других (костистые рыбы) – процесс более сложен: аллантиин превращается в *аллантииновую кислоту*. У амфибий, многих микроорганизмов и большинства растений аллантииновая кислота распадается на *мочевину* и *глиоксиловую кислоту*.



В отличие от гипоксантина и ксантина дезаминированные пиримидиновые основания подвергаются восстановлению. Так, урацил переходит в *дигидроурацил*. В этой реакции донором атомов водорода служит НАДН. Далее дигидроурацил претерпевает гидролиз и превращается в *N-карбамил-β-аланин*, который затем гидролизуется до *β-аланина* и *карбаминовой кислоты*. Карбаминовая кислота либо используется для синтеза мочевины, либо распадается до CO_2 и NH_3 . Все перечисленные реакции катализируются соответствующими ферментами.

Карбаминовая кислота и *β-аланин* являются конечными продуктами распада двух пиримидиновых оснований – *урацила* и *цитозина*. *β-Аланин* путем окислительного расщепления может превращаться в *полуальдегид малоновой кислоты* и в *малонил-КоА*. Он может быть также использован 1) как предшественник в биосинтезе *пантотеновой кислоты* и *кофермента А*; 2) в биосинтезе пептидов *карнозина* (*β-аланилгистидина*) и его N^2 -метилпроизводного, *ансерина*. В случае *тимина* (распадающегося по той же схеме, что урацил и цитозин) вместо *β-аланина* образуется *β-аминоизомасляная кислота*, способная в дальнейшем окислительным путем превращаться в *метилмалонат*.



ГЛАВА ОДИННАДЦАТАЯ МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

11.1. Переваривание и всасывание липидов

Слюна не содержит ферментов, расщепляющих липиды. В желудке у взрослых людей есть *липаза*, но она очень малоактивна.

Переваривание жиров в желудке играет важную роль у детей грудного возраста. У них pH желудочного сока 5,0, что соответствует оптимальному pH липазы и способствует перевариванию эмульгированного молочного жира.

У взрослого человека в желудке происходит разрушение липопротеидных комплексов мембран клеток пищи, что делает жиры более доступными для липазы сока поджелудочной железы.

У человека и млекопитающих жиры, содержащиеся в пище, расщепляются в основном в верхних отделах тонкого кишечника.

В двенадцатиперстной кишке происходит нейтрализация соляной кислоты, попавшей с пищей из желудка, бикарбонатами, содержащимися в панкреатическом и кишечном соках. Пузырьки, образующиеся при этом, способствуют перемешиванию пищи. Одновременно начинается эмульгирование жира. Сильное эмульгирующее действие на жиры оказывают соли желчных кислот, которые попадают в двенадцатиперстную кишку с желчью. Они являются продуктом обмена холестерина. По своей химической природе они – производные холановой кислоты. У человека в желчи содержатся холевая, дезокси-холевая и хенодезоксихолевая кислоты [1].

В малых количествах встречаются и другие желчные кислоты. В желчи желчные кислоты находятся в основном в конъюгированной форме – в виде соединений желчной кислоты с глицином и таурином.

Считается, что необходимую степень эмульгирования жира дает комбинация: соль желчной кислоты + насыщенная жирная кислота + моноглицерид. Соли желчных кислот облегчают эмульгирование жиров и стабилизируют уже образовавшуюся эмульсию благодаря тому, что уменьшают поверхностное натяжение на границе раздела жир – вода.

Желчные кислоты также выполняют важную роль в качестве активатора панкреатической липазы. Этот фермент расщепляет триглицеролы, находящиеся в эмульгированном состоянии. Желчные кислоты, по-видимому, активируют липазу вследствие смещения оптимума ее рН с 8,0 до 6,0, что соответствует рН содержимого двенадцатиперстной кишки. Однако имеются данные, что липаза активируется кофактором (колипазой).

Известно два типа липазы поджелудочной железы. Один из них гидролизует эфирные связи в положениях 1 и 3 триглицерола, другой – в положении 2. При этом гидролиз происходит поэтапно. Сначала осуществляется быстрое расщепление связей 1 и 3, затем медленно идет гидролиз 2-моноглицерола.

Также в расщеплении жиров участвует кишечная липаза, но ее активность невелика. Она гидролизует только моноглицеролы.

Продуктами гидролиза жиров являются глицерин и высшие жирные кислоты, частично моноглицеролы.

Жиры всасываются в верхней части тонкого кишечника. Эмульгированные жировые капли размером 0,5 мкм могут проникать и без гидролиза через кишечную стенку, однако основная часть – после гидролиза.

Глицерол и жирные кислоты с короткой углеродной цепью (менее 10 углеродных атомов) растворимы в воде, всасываются и поступают в кровь воротной вены, оттуда в печень.

Всасывание высших жирных кислот и моноглицеридов происходит при участии желчи. Они образуют мицеллы, составляя их гидрофобное ядро. На поверхности частиц находятся желчные кислоты и фосфолипиды, содержащиеся в желчи. Мицеллы в 100 раз мельче жировых капель. Путем диффузии или пиноцитоза (точно неизвестно) мицеллы проникают в клетки кишечного эпителия, а оттуда – в кровь.

По мнению одних исследователей, желчные кислоты остаются в просвете кишечника. Другие считают, что они с кровью поступают в печень, а оттуда повторно – в желчь.

Точно установлено с помощью метода меченых атомов, что только 15% желчных кислот вновь синтезируются в печени, а 80-90% используются повторно. При этом они совершают по 5-6 оборотов в сутки.

После этого в кишечной стенке синтезируются жиры, специфичные для данного вида животного и отличающиеся по своей природе от пищевого жира. Это обеспечивается тем, что в синтезе жира (и фосфолипидов) частично участвуют эндогенные жирные кислоты.

Однако при скормливание животному после длительного голодания больших количеств чужеродного жира его можно обнаружить в тканях животного в неизменном виде.

Холестерол (холестерин) поступает с яичным желтком, мясом, печенью, мозгом. Эфиры холестерина расщепляются на холестерол и жирные кислоты ферментом холестеролэстеразой (панкреатический и кишечный сок). Холестерол нерастворим в воде, всасывается аналогично жирным кислотам с помощью желчных кислот.

Глицерофосфолипиды гидролизуются в кишечнике панкреатическими фосфолипазами.

Фосфолипаза A₁ гидролизует эфирную связь глицерофосфолипида в положении 1.

Фосфолипаза A₂ расщепляет эфирную связь в положении 2. Образует промежуточные токсичные продукты. Фосфолипаза A₂ поступает в кишечник в неактивной форме, активируется трипсином (отщепляется гептапептид). Нетоксичные продукты образуются при одновременном действии фосфолипаз A₁ и A₂.

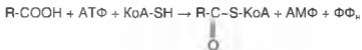
Фосфолипаза C гидролизует связи между фосфорной кислотой и глицеролом, а *фосфолипаза D* – между фосфорной кислотой и азотистым основанием.

Аналогичный механизм расщепления фосфолипидов существует и тканях.

В кишечной стенке также происходит ресинтез фосфолипидов. Далее они соединяются с небольшим количеством белка, образуя стабильные комплексные частицы – хиломикроны. Их диаметр – 100 - 5000 нм. Они поступают в лимфатическую систему, из нее – в кровь, а из крови диффундируют в печень и жировую ткань, в межклеточные пространства. Гидролиз липидов происходит на поверхности печеночных клеток, а возможно и внутри. Образовавшиеся жирные кислоты частично связываются с альбуминами и уносятся с кровотоком, а частично проходят внутрь клеток.

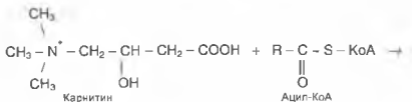
11.2. Окисление жирных кислот

На первом этапе происходит активация молекулы жирной кислоты [2]. С помощью ферментов, которые называются *тиокиназами*, происходит образование сложного эфира жирной кислоты и КоА. Существуют 3 тиюкиназы. Их субстратная специфичность определяется длиной молекулы жирной кислоты. Реакция идет с использованием энергии АТФ:

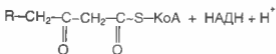
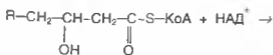


Был идентифицирован промежуточный продукт – аденилат жирной кислоты, образующийся в активном центре фермента тиюкиназы, реагирующий с КоА-SH с образованием АМФ и КоА-производного жирной кислоты. Тиюкиназы содержатся в наружной мембране митохондрий [3].

Далее происходит перенос активированной жирной кислоты внутрь митохондрий. Способность высших жирных кислот проникать через внутреннюю мембрану в виде КоА-эфиров выражена слабо. Она резко возрастает в присутствии карнитина:

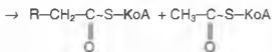
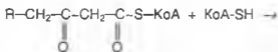


Следующая стадия – дегидрирование. Катализируется 3-оксис-ацил-КоА-дегидрогеназой. Специфическим акцептором электронов является НАД⁺:



Фермент не специфичен в отношении числа атомов углерода, но специфичен в отношении L-стереоизомеров.

Последняя стадия – тиолитического расщепления или тиолиза. Катализируется *тиолазой* (β -кето-тиолазой):



Тиолазы специфичны по отношению к жирным кислотам с различной длиной цепи.

Оставшаяся часть молекулы вступает в последующий цикл β -окисления, в результате которого становится на 2 атома углерода короче – и так до конца молекулы.

ФАДН₂ отдает 2 электрона в дыхательную цепь, в результате чего синтезируются 2 молекулы АТФ.

Ацетил-КоА включается в цикл Кребса. В результате 1 молекула пальмитиновой кислоты дает 130 молекул АТФ.

Окисление ненасыщенных кислот происходит аналогично. Однако у этого процесса имеются специфические особенности. У ненасыщенных жирных кислот, встречающихся в природе (олеиновой, линоленовой), двойные связи имеют цис-конфигурацию. При этом в промежуточных продуктах β -окисления двойные связи имеют транс-конфигурацию. С другой стороны, последовательное удаление двухуглеродных фрагментов при β -окислении приводит к появлению со-

единения с двойной связью между 3 и 4 углеродными атомами, а не между 2 и 3. Такое вещество не сможет быть субстратом для еноил-гидратазы.

В клетке был обнаружен фермент, способный производить перемещение двойной связи из положения 3-4 в положение 2-3. Одновременно происходит изменение конфигурации двойной связи из *cis* в *транс*. Этот фермент называется $\Delta^{3,4}$ -*cis*- $\Delta^{2,3}$ -*транс*-еноил-КоА-изомераза:

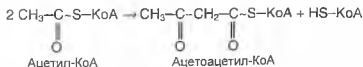


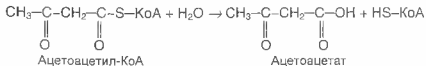
При окислении жирных кислот с двумя и более двойными связями (например, линолевой) требуется еще один фермент – элимераза.

Большая часть природных липидов содержит жирные кислоты с четным числом атомов углерода. Однако встречаются жирные кислоты и с нечетным числом углеродных атомов (растительные, морские организмы; в рубце жвачных образуется пропионовая кислота, продукты метаболизма валина, изолейцина, метионина). В этом случае в результате отщепления по два атома углерода в конечном итоге образуется не ацетил-КоА, а пропионил-КоА. Далее этот продукт карбоксилируется при участии пропионил-КоА-карбоксилазы. Затем происходит его изомеризация, и в конечном итоге образуется сукцинил-КоА, который поступает в цикл Кребса.

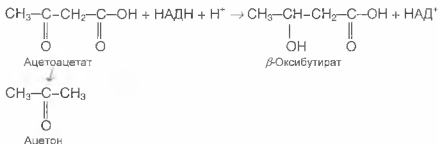
11.3. Кетоновые тела

При диабете ткани не усваивают глюкозу из крови. Чтобы компенсировать это нарушение, печень подпитывает ткани другим способом. Для этого используется ацетил-КоА, который, как было показано выше, образуется при метаболизме не только углеводов, но и липидов:





Эту реакцию катализирует фермент тиолаза. При восстановлении ацетоацетата под действием D-3-оксибутиратдегидрогеназы образуется D-3-оксибутират (β -оксибутират, β -оксимасляная кислота). Из ацетоацетата при декарбоксилировании с участием фермента ацетоацетатдекарбоксилазы образуется ацетон:

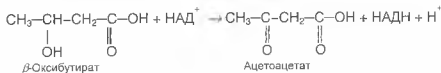


Кроме этого, образование ацетона идет самопроизвольно. Однако эта реакция протекает более медленно.

Кетоновыми телами являются ацетоацетат, β -оксибутират, ацетон.

Ацетоацетат и β -оксибутират не подвергаются окислению в печени, а доставляются кровью к периферическим тканям, где они окисляются в цикле лимонной кислоты. Биологический смысл этих процессов – дополнительный путь для направления топлива в ткани. При диабете и при голодании синтез кетоновых тел увеличивается, являясь компенсаторной реакцией – печень сжигает дополнительные количества липидов для подпитки других органов. При этом ткани не полностью успевают усваивать кетоновые тела, что приводит к их накоплению в крови. В результате этого в крови возрастает концентрация ацетона, который является токсичным веществом.

В тканях β -оксибутират окисляется до ацетоацетата при участии фермента *D-3-оксибутиратдегидрогеназы*:



Дальнейший путь превращений этих продуктов следующий. Ацетат взаимодействует с сукцинил-КоА, в результате чего под действием фермента 3-кетосацил-КоА-трансферазы образуются ацетил-КоА и янтарная кислота. Затем ацетил-КоА реагирует со свободным коэнзимом А с образованием двух молекул ацетил-КоА. Данная реакция катализируется ферментом тиолазой. После этого ацетил-КоА поступает в цикл Кребса.

11.4. Регуляция окисления жирных кислот и образования кетоновых тел

Превращение жирных кислот, содержащихся в цитозоле, может пойти двумя путями:

- 1) окисление в митохондриях;
- 2) превращение в триацилглицеролы и фосфолипиды под действием ферментов цитозоля.

Какой путь будет преобладать? Если жирная кислота соединится с карнитином, то попадет в митохондрию и окислится. Если не соединится, то останется в цитозоле и войдет в состав липидов. Все зависит от активности карнитин-ацилтрансферазы. Для этого фермента характерно аллостерическое ингибирование малонил-КоА. А это первый промежуточный продукт биосинтеза жирных кислот из ацетил-КоА.

Его концентрация повышается, когда организм получает много углеводов.

Избыток глюкозы, сверх того, что может быть отложено в запас в виде гликогена, превращается в жиры. Таким образом, окисление жиров прекращается всегда, когда есть избыток глюкозы. Это обеспечивается аллостерическим ингибированием поступления жирных кислот в митохондрии. Ацетил-КоА, образующийся в митохондриях печени, может быть или окислен через цикл Кребса, или превращен в кетоновые тела.

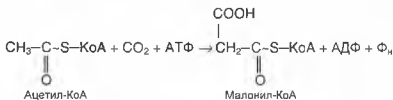
Возможность включения ацетил-КоА в цикл Кребса лимитируется количеством щавелевоуксусной кислоты. Если мало щавелевоуксусной кислоты, мало ацетил-КоА включается в цикл Кребса, и он идет на образование кетоновых тел. А это бывает при недостатке углеводов, то есть при голодании или малом содержании углеводов в пище. В этом случае питание тканей обеспечивается за счет оксипутирата и ацетата, которые в периферических тканях включаются в цикл Кребса.

11.5. Биосинтез высших жирных кислот

В организме человека и животных липиды могут запасаться в достаточно больших количествах. Для сравнения, запас гликогена, который обычно имеется в печени и мышцах человека, составляет несколько сотен граммов. Такого количества может хватить для обеспечения потребности человека в энергии на протяжении полусуток. В то же время запас жиров достигает 10 – 20 и более килограммов. Накопленной в них энергии может хватить на 2 месяца. Если потребление человеком углеводов превышает те количества, которые могут быть запасены в виде гликогена, они превращаются в жиры.

Наиболее значимым биохимическим процессом в метаболизме липидов является биосинтез высших жирных кислот.

Синтез высших жирных кислот не является реакцией, обратной распаду. Данный процесс начинается с того, что ацетил-КоА подвергается карбоксилированию, в результате чего образуется малонил-КоА. Эту необратимую реакцию катализирует ацетил-КоА-карбоксилаза. Участвующая в реакции CO_2 образует свободную карбоксильную группу малонил-КоА:



Ацетил-КоА-карбоксилаза – сложный фермент. Его молекула состоит из 4 субъединиц. В качестве простетической группы содержит биотин. Сначала CO_2 присоединяется к биотину (образуется промежуточный продукт карбоксибиотин), затем она переносится на ацетил-КоА и образуется малонил-КоА. Необратимость реакции обеспечивается за счет энергии АТФ.

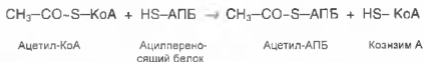
Именно эта реакция является лимитирующим этапом, то есть определяет скорость биосинтеза жирных кислот в клетке. Аллостерическим активатором является цитрат. Как только концентрация цитрата увеличивается, запускается синтез липидов.

В клетке имеется семь ферментов, участвующих в биосинтезе жирных кислот. Они объединены в единый комплекс с молекулярной

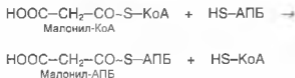
массой около 400 000. Такое объединение, вероятно, необходимо, чтобы ускорить процесс биосинтеза жирных кислот.

Важную роль в этой системе играет ацилпереносящий белок (АПБ), с которым ковалентно связываются промежуточные продукты биосинтеза жирных кислот. Это небольшой белок (молекулярная масса 9000), содержит простетическую группу 4-фосфопантотеин, в которую входит витамин пантотеновая кислота. АПБ переносит промежуточные продукты реакции последовательно от одного активного центра к другому.

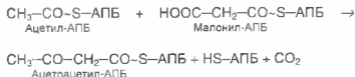
Ферментный комплекс имеет две сульфгидрильные группы. В ходе первой реакции ацетильная группа переносится ферментом АПБ-ацетилтрансферазой с ацетил-КоА на SH-группу цистеина в молекуле АПБ:



Затем малонильная группа малонил-КоА переносится на сульфгидрильную группу 4-фосфопантотеина в АПБ под действием фермента АПБ-малонилтрансферазы:



На первом этапе удлинения углеродной цепи жирной кислоты ацетильная и малонильная группы подвергаются конденсации под влиянием фермента β -кетоацил-АПБ-синтетазы с образованием ацетоацетильной группы, ковалентно связанной с SH-группой 4-фосфопантотеина (ФП). Одновременно с этим происходит выделение CO_2 :



ролитического фермента деацилазы молекула пальмитиновой кислоты отщепляется.

Особенностью биосинтеза ненасыщенных жирных кислот является отщепление водорода от образовавшейся молекулы при помощи ферментов десатураз. Полиненасыщенные кислоты в организме человека не синтезируются и поступают в него с пищей.

При синтезе жирных кислот используется 2 вида химической энергии. Это энергия АТФ и восстановленный НАДФН. АТФ расходуется при образовании тиоэфирной связи ацетил-КоА, а также при синтезе малонил-КоА в реакции присоединения двуокиси углерода. НАДФН используется для восстановления двойных связей.

Источником НАДФН в печени является пентозофосфатный цикл. Кроме этого, в жировых клетках НАДФН образуется в результате действия малатдегидрогеназы. В этой реакции яблочная кислота превращается в пировиноградную с выделением CO_2 . Одновременно происходит восстановление НАДФ.

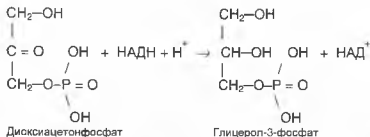
Обобщая вышесказанное, можно отметить основные отличия ферментативного окисления высших жирных кислот от их ферментативного синтеза:

- 1) внутриклеточная локализация (митохондрия – цитозоль);
- 2) природа переносчика ацильных групп ($\text{CoA-SH} - \text{АПБ-SH}$);
- 3) форма, в которой двухуглеродные единицы отщепляются от цепи жирной кислоты или присоединяются к ней (ацетил-КоА – малонил-КоА);
- 4) стереоконфигурация промежуточного β -гидроксиацильного соединения;
- 5) тип пиридинового нуклеотида, используемого в восстановительных реакциях (НАД (ФАД) – НАДФ);
- 6) участие CO_2 .

11.6. Биосинтез жиров

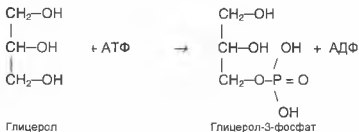
Предшественниками для синтеза жиров в организме являются жирные кислоты в активированной форме, то есть в виде эфиров с КоА, и глицерол-3-фосфат.

Глицерол-3-фосфат может синтезироваться двумя путями. В процессе гликолиза происходит образование диоксиацетонфосфата, который затем восстанавливается до глицерол-3-фосфата:



Реакция катализируется глицеролфосфатдегидрогеназой, кофермент – НАДН.

Возможен и другой путь образования глицерол-3-фосфата – из глицерола под действием глицеролкиназы:



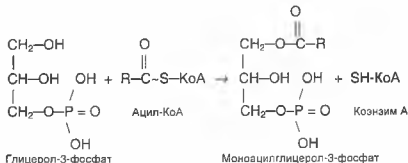
Описанные процессы в организме в целом обратимы. Возможен синтез из глицерола диоксиацетонфосфата, а через соответствующее число стадий – глюкозы. Кроме этого глицерол-3-фосфат может быть использован при биосинтезе фосфолипидов.

Другими предшественниками жиров являются жирные кислоты. Сначала они активируются:



Реакция катализируется ацил-КоА-синтетазой.

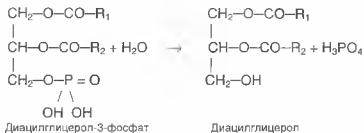
На начальном этапе синтеза жиров происходит ацилирование свободных гидроксильных групп фосфоглицериновой кислоты:



Реакцию катализирует глицерофосфатацил-трансфераза.

Аналогично ацилируется второй гидроксил.

Диацилглицерол-3-фосфат (фосфатидная кислота) встречается в клетках в следовых количествах как промежуточный продукт и быстро расходуется – подвергается гидролизу фосфатазой:



Далее диацилглицерол взаимодействует с третьей молекулой ацил-КоА, превращаясь в триацилглицерол.

Образование каждой эфирной связи требует затраты энергии, которая возникает при синтезе ацил-КоА с использованием энергии АТФ (пирофосфатное окисление).

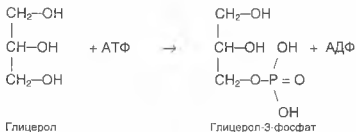
В норме в организме происходит синтез и окисление жиров. Эти процессы находятся в динамическом равновесии. В тех случаях, когда пищевые вещества поступают в организм в избытке, они запасаются в виде отложений жира. При этом синтез жиров может идти как из жирных кислот и глицерина, так и из углеводов и аминокислот.

Скорость биосинтеза жиров меняется под действием гормонов. Так, инсулин стимулирует превращения углеводов в жиры. При тяжелых формах диабета больной не только лишается возможности нормально усваивать глюкозу, но и синтезировать жирные кислоты из углеводов и аминокислот. В результате происходит увеличение скорости окисления жиров и образования кетоновых тел. Следствием этого может быть потеря веса [4].

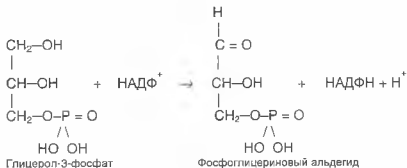
На обмен жиров также оказывает влияние глюкагон, гормоны коры надпочечников (глюкокортикоиды), гипофизарный гормон роста.

11.7. Превращения глицерола в тканях

Глицерол, образовавшийся в результате гидролиза жиров в клетке или всосавшийся из кишечника, может фосфорилироваться с образованием глицерол-3-фосфата (фосфоглицериновая кислота). Реакция катализируется глицеролкиназой:



Затем глицеролфосфат окисляется до фосфоглицеринового альдегида:



А это уже промежуточный продукт гликолиза. Далее он может быть использован для синтеза глюкозы или включиться в процесс гликолиза и затем через пируват и ацетил-КоА в цикл Кребса [5].

ГЛАВА ДВЕНАДЦАТАЯ БИОЭНЕРГЕТИКА

12.1. Макроэргические соединения

Комплекс высокоинтегрированных реакций, протекающих в клетке, называется метаболизмом. Метаболизм может быть разделен на совокупность процессов синтеза (анаболизм) и совокупность процессов распада (катаболизм). В свою очередь катаболизм включает энергетический катаболизм – совокупность реакций распада, идущих с одновременным синтезом макроэргических соединений, – и все остальные процессы распада.

Наиболее ценной для понимания энергетики метаболических процессов термодинамической концепцией является концепция **свободной энергии**. Под свободной энергией понимают ту часть потенциальной энергии реагирующих веществ, которая может быть использована для осуществления полезной работы.

Свободная энергия (G) определяется уравнением Гиббса $G=H - TS$, где H – *энтальпия*; T – абсолютная температура; S – *энтропия*.

Энтальпия представляет собой сумму внутренней энергии системы (E) и произведения давления (P) на объем (V): $H = E + PV$.

Энтропия обозначает меру «микроскопического беспорядка системы».

Изменение свободной энергии (ΔG) служит критерием спонтанного протекания химических процессов и вычисляется по уравнению: $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$.

Реакции могут протекать спонтанно только в том случае, если свободная энергия уменьшается, то есть $\Delta G < 0$. Такие реакции называются *экзергоническими*. Если свободная энергия возрастает ($\Delta G > 0$), то реакция требует дополнительного источника энергии. Это *эндергонические* реакции. В случае равновесных реакций (обратимых) изменение свободной энергии близко к нулю ($\Delta G = 0$).

Таким образом, для любого самопроизвольного (необратимого) процесса ΔG – отрицательная величина. Соответственно, реакция может протекать спонтанно только при отрицательном значении изменения свободной энергии (ΔG). При этом ΔG не зависит от

пути, по которому идет реакция, и зависит только от природы реагирующих веществ и их активности.

Понижение свободной энергии – это мера максимального количества работы, которую можно совершить с помощью данной реакции, если, конечно, реакция как-то сопряжена с системой, способной в ходе обратимого процесса совершать работу. Эта работа может быть электрической, мышечной или осмотической, совершаемой за счет реакций, протекающих в биологических системах. В любой реакционной системе совершаемая работа неизбежно меньше максимально возможной, поскольку реальные процессы необратимы, то есть сопровождаются возрастанием энтропии вследствие диссипации (рассеяния) энергии.

Общей тенденцией всех необратимых спонтанно протекающих и термически изолированных процессов является стремление свободной энергии к минимуму, а энтропии – к максимуму. Переход от живых к неживым системам всегда связан с ростом энтропии. Образование биологических структур (возрастание упорядоченности) связано со снижением энтропии. Неупорядоченные состояния, как правило, более вероятны и обладают более высокой энтропией.

Изменение свободной энергии в условиях, когда как реагирующие вещества, так и продукты реакции находятся в *стационарном состоянии* (молярная концентрация; температура 25°C (298°K); $\text{pH}=0$; давление 1 атм), называется изменением **стандартной свободной энергии** (ΔG°). Равновесие биохимических реакций сильно зависит от pH среды. Так как $\text{pH}=0$ не является физиологической, биохимики обычно используют понятие ΔG^{σ} , обозначающее изменение стандартной свободной энергии при $\text{pH} 7,0$.

Энергетические превращения, протекающие в живой клетке, могут быть подразделены на две группы: одни из них происходят в мембранах, а другие – в немембранных отделах протоплазмы. Превращение одной формы энергии в другую является важнейшей функцией многих биомембран. Данная функция осуществляется специальными белками, которые встроены в особого типа мембрану, называемую *энергопреобразующей*. Энергопреобразующая мембрана способна к преобразованию энергии химической связи окисляемых субстратов или энергии света в электрическую энергию, а именно в *трансмембранную разность электрических потенциалов*.

К энергопреобразующим мембранам, имеющим наибольшее биологическое значение, относятся внутренняя мембрана митохондрий, видоизменения цитоплазматической мембраны у бактерий, тилакоиды хлоропластов и фототрофных бактерий, внешняя мембрана эукариотических клеток [4].

В большинстве случаев преобразование энергии в бисмембранах описывается общей схемой:

Энергетические ресурсы $\rightarrow \Delta\mu_I \rightarrow$ Работа,

где $\Delta\mu_I$ – трансмембранная разность электрохимических потенциалов иона I.

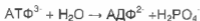
Энергетические ресурсы, потребляемые мембранной системой, сначала используются для транспорта иона I через мембрану против сил электрического поля и в направлении большей концентрации данного иона. Этот процесс называют *энергизацией мембраны*. Затем энергия, накопленная в электрической и осмотической форме, используется в качестве движущей силы, чтобы совершать ту или иную полезную работу. Таким образом, процессы утилизации внешней энергии и совершения работы оказываются сопряженными через образование и использование $\Delta\mu_I$. Поэтому ион I называется *сопрягающим ионом*. В энергопреобразующих мембранах роль сопрягающих ионов играют ионы H^+ и Na^+ . Энергия $\Delta\mu_{H^+}$ и $\Delta\mu_{Na^+}$ может обратимо превращаться в энергию химических связей высокоэнергетических веществ, аккумуляторов свободной энергии в клетках [4].

Аккумуляторами свободной энергии в клетках служат **макроэргические соединения**. Свое название они получили из-за того, что содержат в своем составе связь, расщепление которой характеризуется высокими отрицательными значениями ΔG^0 . Наличие такой связи обычно приводит к термодинамической нестабильности данных соединений, стремящихся избавиться от нее и перейти в более энергетически выгодное состояние. Все макроэргические соединения можно подразделить на несколько групп: нуклеозидтрифосфаты; другие ангидриды фосфорной кислоты; тиозифиры.

Нуклеозидтрифосфаты

Универсальной энергетической «валютой» в клетке являются аденозинтрифосфаты, представляющие собой 5'-фосфат аденозина. Активная форма АТФ – это обычно его комплекс с Mg^{2+} или Mn^{2+} .

Рассмотрим реакции гидролиза двух органических фосфатов – АТФ и глюкозо-6-фосфата:



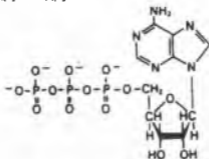
$$\Delta G^0 = -32,9 \text{ кДж/моль}$$



$$\Delta G^0 = -16,4 \text{ кДж/моль.}$$

Уменьшение свободной энергии в ходе гидролиза для АТФ вдвое больше, чем для глюкозо-6-фосфата. Таким образом, глюкозо-6-фосфат термодинамически более устойчив, чем АТФ, и его гораздо легче получить путем реакции, обратной гидролизу. Кроме того, в присутствии соответствующего катализатора фосфорильная группа с АТФ может самопроизвольно перейти на глюкозу, но не наоборот.

Поскольку уменьшение свободной энергии в процессе гидролиза служит количественной термодинамической характеристикой способности группы к переносу на другой нуклеофил (соединение, способное принимать протоны), ее называют **потенциалом переноса**. АТФ, таким образом, термодинамически неустойчивая молекула, которая обладает более высоким **потенциалом переноса** фосфатных групп, чем некоторые другие фосфаты. Термодинамическая неустойчивость обусловлена тем, что при рН 7,0 трифосфатный компонент АТФ несет 4 отрицательных заряда. Эти заряды сильно отталкиваются, поскольку находятся в непосредственной близости друг от друга:



Электростатическое отталкивание снижается при гидролизе. Именно эта неустойчивость позволяет АТФ выполнять функцию переносчика химической энергии, необходимой для выполнения большей части энергетических потребностей клеток.

Центральную роль в энергообмене клеток всех типов играет **аденилатная система**, которая включает АТФ, АДФ, АМФ, а также неорганический фосфат и Mg^{2+} .

Фосфоангидридная связь в молекуле АТФ образуется путем соединения АДФ и неорганического фосфата, которое осуществляется в ходе ряда специфических реакций **фосфорилирования**. Превращение же АМФ в АДФ осуществляется путем переноса концевой фосфорильной группы с АТФ на АМФ в ходе реакции, катализируемой аденилаткиназой, которая присутствует во всех клетках и необычайно активна:



Для оценки потенциала фосфорилирования аденилатной системы внутри клеток используют чаще всего 2 показателя: *степень фосфорилирования* (R_p)

$$R_p = [\text{АТФ}] / [\text{АДФ}] \cdot [\text{Ф}_n]$$

и *энергетический заряд клетки* (ЭЗК)

$$\text{ЭЗК} = ([\text{АТФ}] + 0,5[\text{АДФ}]) / ([\text{АТФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АМФ}]).$$

Энергетический заряд клетки теоретически меняется от 0 (в клетке присутствует только АМФ) до 1 (в клетке присутствует только АТФ). Этот коэффициент является безразмерной величиной, так как единицы концентрации сокращаются. На самом деле ЭЗК составляет 0,7-0,8, при значении ЭЗК = 0,5 клетка погибает.

Другие нуклеозидтрифосфаты, аналоги АТФ, также являются макроэргическими соединениями. Они способны обмениваться концевыми фосфатными группировками. Реакции катализируются специфическими фосфотрансферазами (киназами):



АТФ является главным, непосредственно используемым донором свободной энергии. В обычной клетке молекула АТФ расходуется в течение одной минуты после ее образования. Скорость оборота АТФ очень высока, но клетка стремится поддерживать количество АТФ на постоянном уровне.

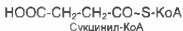
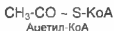
Ангидриды фосфорной кислоты

В клетках присутствуют и образуются также другие фосфаты, обладающие высоким потенциалом переноса фосфатной группы, чаще еще более высоким, чем нуклеозидтрифосфаты. Это такие соединения, как фосфоенолпируват, 1,3-дифосфоглицерат, ацетилфосфат (у бактерий), креатинфосфат, карбомилфосфат, ацилфосфаты. Образование таких соединений делает возможным синтез АТФ путем переноса фосфорильной группы на АДФ (*субстратное фосфорилирование*).

Тиозфиры

Данные макроэргические соединения являются производными **кофермента А**, который, в свою очередь, является сложным органическим веществом, включающим в свой состав АМФ с дополнительным фосфатом по 3'-атому углерода в рибозе, пантотеновую кислоту и β-меркаптоэтиламин. В конце молекулы присутствует реакционноспособная SH-группа. Поэтому встречается схематичное изображение кофермента А в виде CoA-SH .

При образовании соединений с CoA-SH по тиоловой группировке формируется макроэргическая связь. Образование таких соединений имеет большое значение в процессах метаболизма. Примерами таких соединений служат:



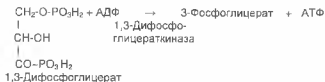
Ацил-КоА, где R - остаток жирной кислоты.

Встречаются и другие макроэргические соединения на основе CoA-SH : малонил-КоА, пропионил-КоА и т.п.

12.2. Субстратное фосфорилирование

Если в процессах энергетического катаболизма образуется макроэргическое соединение, обладающее более высоким потенциалом переноса фосфатной группировки, чем АТФ, то становится возможным процесс образования АТФ из АДФ. *Процесс образования АТФ с использованием высокоэнергетической связи субстрата, возникающего в ходе метаболизма, называется*

субстратным фосфорилированием (или синтезом АТФ на уровне субстрата). Примерами может служить синтез АТФ при образовании 1,3-дифосфоглицерата и 2-фосфоенолпирувата в гликолизе:



и сукцинил-КоА в ходе цикла трикарбоновых кислот:



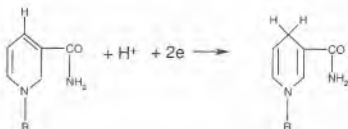
12.3. Окислительное фосфорилирование

Кроме макроэргических соединений, содержащих богатую энергией связь, в живых системах широко распространены молекулы, обладающие высоким потенциалом переноса электронов. Чаще всего они представлены такими переносчиками электронов, как пиридиновые нуклеотиды, флавиновые производные, убихиноны, цитохромы, железосерные белки. Обычно окислительно-восстановительный потенциал (редокс-потенциал) системы сравнивают с потенциалом водородного электрода, который при рН 7,0 равен $-0,42$ В. Наиболее высоким восстановительным потенциалом из встречающихся в организмах переносчиков электронов обладают пиридиновые нуклеотиды. Пара $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$ имеет окислительно-восстановительный потенциал равный $-0,32$ В.

Пиридиновые нуклеотиды

К пиридиновым нуклеотидам относятся никотинамид-адениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотид-фосфат (НАДФ). Чистый НАДФ выделили в 1934 г. из эритроцитов выдающиеся биохимики XX века Варбург и Кристиан при изучении процесса окисления глюкозо-6-фосфата. Они пришли к выводу о

близости НАД и НАДФ и предположили, что оба соединения функционируют в качестве переносчиков электронов. Принимать и отдавать электроны способен никотинамидный компонент этих нуклеотидов:



Как видно из схемы реакции, никотинамидный остаток присоединяет $2e$ по раскрывающейся связи и только один протон, поэтому восстановленную форму НАД и НАДФ следует записывать так: НАДН + H^+ и НАДФН + H^+ , а в окисленной форме: НАД $^+$ и НАДФ $^+$.

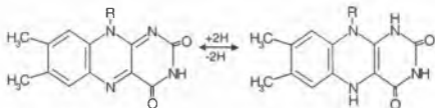
Пиридиновые нуклеотиды служат коферментами очень большого количества дегидрогеназ. Причем НАД $^+$ является универсальным акцептором протонов, поэтому чаще участвует в процессах окисления, а НАДФН – универсальным донором и участвует в процессах синтеза, восстановления белков, аскорбиновой кислоты, глутатиона. Наиболее предпочтительная реакция, катализируемая дегидрогеназами с участием НАД, выглядит следующим образом:



Флавиновые коферменты

Флавинадениндинуклеотид (ФАД) и рибофлавин-5'-фосфат (флавиномононуклеотид, ФМН), возможно, самые универсальные, часто встречающиеся переносчики электронов. На самом деле оба соединения химически нуклеотидами не являются, однако термины слишком прочно вошли в обиход. Обнаружены были в 20-х годах XX века О. Варбургом и названы «желтыми ферментами» за интенсивно желтый цвет, обусловленный рибофлавином.

Прием и отдача электронов и протонов ФАД и ФМН осуществляется за счет изоаллоксазинового кольца:



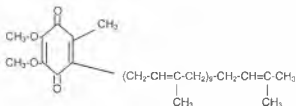
Так как изоаллоксазиновое кольцо принимает сразу 2e и 2 протона, восстановленные формы ФАД и ФМН следует записывать: ФАДН₂ и ФМНН₂. Обычно флавиновые коферменты прочно связаны с белками и совершают обороты между восстановленными и окисленными соединениями, оставаясь прикрепленными к одной и той же молекуле белка. Типичные реакции окисления-восстановления с участием флавиновых коферментов:

1. $\text{HOOC-CH}_2\text{OH} + \text{ФАД} \xrightarrow{\text{Гликоксилатоксидаза}} \text{ФАДН}_2 + \text{HOOC-CHO}$
Гликолевая кислота Гликоксилат
2. $\text{R-CHNH}_2\text{-COOH} + \text{ФАД} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \xrightarrow{\text{Оксидаза аминокислот}} \text{R-CO-COOH} + \text{NH}_3 + \text{ФАДН}_2$
Оксидаза аминокислот
3. $\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH} + \text{ФАД} \xrightarrow{\text{Сукцинатдегидрогеназа}} \text{HOOC-CH=CH-COOH} + \text{ФАДН}_2$
Янтарная кислота Фумаровая кислота

Убихиноны

Единственными небелковыми и несвязанными с белками переносчиками электронов служат хиноны. Кроме убихинона («вездесущий хинон»), встречаются также менахиноны, пластохиноны, характерные для фотосинтетических путей транспорта электронов. Убихинон при восстановлении может принимать e и H⁺, переходя в полувосстановленное состояние, или 2e и 2H⁺, восстанавливаясь полностью. При одноэлектронном восстановлении он переходит в гидрохинон. Очень длинный гидрофобный «хвост» придает убихинону способность легко внедряться и свободно перемещаться в неполярном слое внутренней митохондриальной мембраны. Название *кофермент Q* неверно, но прочно вошло в обиход биохимии.

миков. Неверным оно является потому, что убинон в мембране не имеет белкового носителя:



Убинон (кофермент Q)

Железосерные белки

Негемовые железосодержащие белки. Атомы железа в них связаны с сульфгидрильными группами остатков цистеина белка, образуя железосерные комплексы (рис.12.1).

Железо в железосерных комплексах способно переходить из Fe^{2+} в Fe^{3+} и наоборот, отдавая или принимая электрон. Таким образом, железосерные белки способны принимать и отдавать электроны, но не протоны.

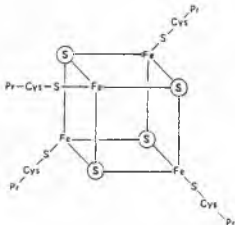


Рис. 12.1. Железосерный центр (Fe_4S_4) железосерного белка: S^* - неорганическая сера; Pr - апобелок, связанный с центром через остаток цистеина [3]

Цитохромы

Представлены группой белков, выполняющих функцию одно-электронных переносчиков, активным центром которых является гемовая структура. Выделено и описано множество цитохромов. По введенной Кейлином классификации, основанной в настоящее время на типах гемовых структур, различают группы цитохромов *a*, *b*, *c*.

Цитохромы *b*-типа содержат протогем, и типичные цитохромы *b* не реагируют непосредственно с кислородом, то есть не способны переносить электрон непосредственно на кислород. К *b*-типу относится группа цитохромов P-450 (по полосе поглощения при длине волны 450 нм), участвующих в реакциях гидроксирования в микросомах. Цитохромы *c*-типа являются одними из немногих внутриклеточных гемовых пигментов, растворимых в воде, и легко удаляются из мембраны. Это небольшие белки, где гем служит каркасом, на который наматывается пептидная цепь. Цитохромы *a* способны передавать электроны непосредственно на кислород, такой же способностью обладают, например, цитохромы *o* и *d*, встречающиеся у бактерий.

12.3.1. Организация компонентов дыхательной цепи

Наибольшее количество АТФ в клетке синтезируется в процессе окислительного фосфорилирования. **Окислительным фосфорилированием называется процесс образования АТФ, сопряженный с переносом электронов по дыхательной цепи на кислород или другой акцептор.**

Другими акцепторами могут служить нитраты, нитриты, сульфаты, сульфиты. При этом они восстанавливаются соответственно до молекулярного азота или аммонийной формы азота, молекулярной серы или сероводорода.

Переносчики электронов размещены на поверхности или в глубине внутренней митохондриальной мембраны.

Типичная митохондрия имеет примерно такие же размеры, как клетка *E. coli*, но форма и размеры этих органелл в разных клетках могут быть весьма различны. Во всех случаях митохондрия образована двумя замкнутыми мембранами (наружной и внутренней), каждая толщиной –5–7 нм. Внутренняя мембрана для многих соединений непроницаема, здесь располагаются все компоненты дыхательной цепи. Кроме этого, на грибовидных выростах внут-

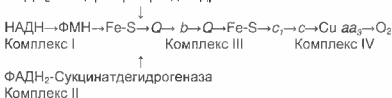
ренной мембраны, обращенных в матрикс, располагаются АТФ-синтазные комплексы.

В матриксе митохондрий находятся многие ферменты цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), кроме флавопротеинов, локализованных во внутренней мембране со стороны матрикса (М-сторона). ФАД-зависимая глицеролфосфатдегидрогеназа локализована с наружной стороны внутренней мембраны митохондрий (С-сторона).

Наружняя мембрана митохондрий содержит моноаминоксидазу, цитохром b_5 и другие белки. Для межмембранного пространства одним из характерных белков считается фермент аденилаткиназа, ключевой фермент, поддерживающий равновесие между АТФ, АДФ и АМФ.

Итак, переносчики электронов локализованы на внутренней мембране митохондрий, где также расположены АТФ-синтазные комплексы. Таким образом, энергия переноса электронов сопряженно тратится на синтез АТФ. Рассмотрим сначала организацию дыхательной цепи, транспорт электронов по ней, затем строение АТФ-синтазного комплекса и, наконец, механизм сопряжения. В какой же последовательности располагаются переносчики электронов? Представим это в виде схемы. Хотя она и не отражает действительной последовательности движения электронов, но дает представление о включении их в дыхательную цепь с различных редуктазных систем:

ФАДН₂-Глицеролфосфатдегидрогеназа



где Fe-S – железосерные комплексы;

b – цитохромы типа b ;

Q – убихинон;

c_1, c – цитохромы типа c ;

Cu aa_3 – цитохромоксидазный комплекс.

Комплекс I (НАДН-Q-редуктаза) содержит в своем составе флавинонуклеотид и железосерный белок.

Комплекс II (ФАДН₂-сукцинат- Q-редуктаза) состоит из фермента сукцинатдегидрогеназы, ковалентно связанного с ФАД.

Оба комплекса передают электроны на убихинон.

Комплекс III (Q-цитохром-с-редуктаза) представлен железосерным белком и цитохромами b , b_1 , c_1 .

Небольшой водорастворимый белок – цитохром-с – в окисленном состоянии связан с комплексом III, а восстановленный – с комплексом IV.

Комплекс IV (цитохромоксидаза) состоит из цитохрома a и a_3 , расположенных асимметрично и трансмембранно. В составе цитохромоксидазы обнаруживаются, кроме двух гемов, несколько атомов меди, прочно связанных с белком.

Рассмотрим механизм передачи электронов на примере НАДН-редуктазного комплекса (комплекс I) как начального донора электронов. Итак, проследим путь $2e$ от НАДН к кислороду, не рассматривая энергетику этого процесса. Суммарный процесс разбит на три стадии, каждая из которых катализируется тремя липопротеидными комплексами, встроенными во внутреннюю мембрану митохондрий (рис.12.2). Переносчики электронов расположены по цепи так, что ΔG^0 постепенно уменьшается, а редокс-потенциал (восстановительный потенциал) снижается, тогда как окислительный возрастает (отрицательные величины постепенно сменяются на положительные). Таким образом, на каждом этапе передачи электронов соседнему по цепи переносчику высвобождается свободная энергия.

Между комплексами электроны перемещаются вместе с подвижными переносчиками: убихиноном и *цитохромом с*. Электрон передается от НАДН через ФМН на Fe-S-белок и затем на убихинон, который совершает «круг почета» и в этот момент находится в полувосстановленном состоянии. Принимая электрон от железосерного белка комплекса I и присоединяя протон (H^+) из матрикса митохондрий, убихинон полностью восстанавливается и, перемещаясь по мембране, отдает H^+ в межмембранное пространство, а электрон передает на цитохром b_1 , снова переходя в полувосстановленное состояние. Электрон с b_1 передается на цитохром b_2 ; QH передает электрон на железосерный белок комплекса III, протон же опять поступает в межмембранное пространство. Полностью окисленный убихинон возвращается к цитохрому b_2 и забирает у него электрон,

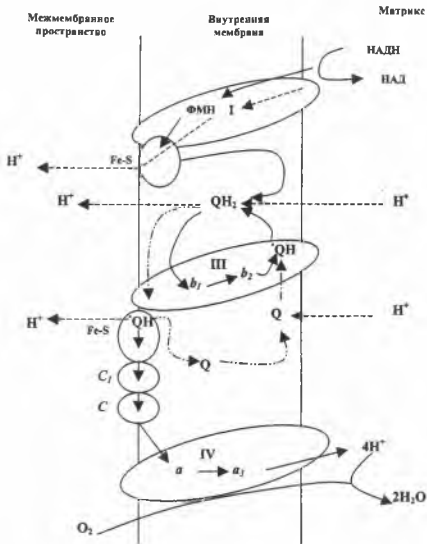


Рис. 12.2. Схема расположения переносчиков электронов в дыхательной цепи. Путь электронов изображен сплошной линией, перемещение протонов – пунктиром, а убинона – пунктиром с точкой [2]

присоединяя протон из матрикса митохондрий. При этом он снова переходит в полувосстановленное состояние и готов принять электрон от железосерного белка комплекса I и еще один протон из матрикса. Так совершается круг убихинона. Путь же электрона от железосерного белка комплекса III лежит на цитохром *c*, и далее на цитохром *c*. Получив электрон, цитохром *c* мигрирует на комплекс $Cu\ a_a_3$ (цитохромоксидазу) и передает электрон цитохромоксидазному комплексу, в активном центре которого находится медь переменной валентности. Затем электрон передается на кислород, и при участии протонов из матрикса образуется вода.

Так осуществляется транспорт электронов по дыхательной цепи митохондрий. В ходе данного переноса освобождается энергия и происходит накопление протонов в межмембранном пространстве митохондрий. Это приводит к генерации трансмембранного потенциала $\Delta\mu H^+$, который и обеспечивает синтез АТФ.

Процесс окисления НАДН кислородом может быть сопряжен с переносом ионов H^+ из матрикса митохондрий (у бактерий из цитоплазмы) в межмембранное пространство митохондрий (у бактерий – в периплазматическое пространство). Каждый из комплексов I, III и IV сам по себе способен транслоцировать ионы водорода через мембрану и поэтому может быть отнесен к ферментам, генерирующим $\Delta\mu H^+$. Комплекс II (сукцинат-Q-редуктаза) переносит водород от сукцината на убихинон без участия НАД. Это изоэнергетическая реакция, не связанная с преобразованием энергии.

Восстановленные эквиваленты могут поступать в дыхательную цепь на различных ее уровнях в зависимости от *редокс-потенциала* (восстановительный потенциал) окисляемого субстрата. Если потенциал оказывается меньше, равен или лишь немногим больше $-0,3\text{ В}$ (редокс-потенциал пары $НАДН / НАД^+$), то в окислении такого субстрата может участвовать вся дыхательная цепь. Примером могут служить две реакции дегидрогенизации в цикле Кребса (изоцитратдегидрогеназная и малатдегидрогеназная), а также вторая реакция дегидрогенизации в системе β -окисления жирных кислот. Если редокс-потенциал субстрата значительно ниже, чем у НАДН, восстановленный эквивалент переносится на средний или конечный участок дыхательной цепи. Так окисляются сукцинат (редокс-потенциал равен $+0,03\text{ В}$) и ацил-КоА. И сукцинатдегидрогеназа, и ацил-КоА-дегидрогеназа передают электроны в дыхательную цепь на уровне комплекса III, начи-

ная с цитохрома *b* [3]. Если же редокс-потенциал субстратов окисления намного отрицательней такового пары НАДН/НАД⁺, то становится возможным образование АТФ вне дыхательной цепи, то есть осуществление субстратного фосфорилирования

Рассмотрим теперь механизм сопряжения транспорта электронов по дыхательной цепи и генерации $\Delta\mu\text{H}^+$ с синтезом АТФ.

12.3.2. Сопряжение процессов дыхания и синтеза АТФ

Синтез макроэргической связи при присоединении фосфата к АДФ в митохондриальной мембране осуществляется с помощью H^+ -АТФ-синтаз. Для работы этого фермента, естественно, требуется энергия, так как гидролиз АТФ гораздо более энергетически выгоден, чем синтез. Одна из причин того, что синтез АТФ из АДФ и P_i является энергетически невыгодным процессом, заключается в том, что в водных растворах фосфатные группы этих молекул ионизированы и несут отрицательные заряды, локализованные на атомах кислорода. Для образования ковалентной химической связи между АДФ и P_i эти отрицательные группы необходимо сблизить на достаточно близкое расстояние, для чего требуется совершить сравнительно большую работу по преодолению силы электростатического отталкивания.

Важнейшей задачей биоэнергетики было изучение механизмов функционирования H^+ -АТФ-синтазы, представляющей собой большой ферментативный комплекс, расположенный на внутренней мембране митохондрий. Большое значение для понимания молекулярных механизмов работы H^+ -АТФ-синтазы имеет детальное знание пространственной структуры данного ферментативного комплекса, хорошо изученной в настоящее время.

Комплекс H^+ -АТФ-синтазы по форме напоминает гриб, ножка которого погружена в мембрану, а круглая шляпка обращена в матрикс митохондрий. Мембранная часть H^+ -АТФ-синтазного комплекса, называемая фактором сопряжения F_0 , представляет собой гидрофобный белковый комплекс. Второй фрагмент H^+ -АТФ-синтазного комплекса – фактор сопряжения F_1 – выступает из мембраны в водную фазу в виде сферы. В хлоропластах фактор сопряжения F_1 обращен, в отличие от митохондрий, в строму хлоропласта.

Работа H^+ -АТФ-синтазного комплекса обусловлена переносом через него протонов. Для нормального функционирования F_0F_1 -комплекса необходимо, чтобы сопрягающая мембрана была замкнутой и концентрация ионов водорода по обе ее стороны различалась, создавая разность электрических потенциалов $\Delta\phi$, под действием которой протоны переносятся через комплекс. Мембранный фрагмент F_0 выполняет роль специфического протонного канала, по которому H^+ попадает к F_1 .

При отсутствии субстратов фосфорилирования (АДФ и P_i) утечка протонов через F_0F_1 невелика. В этом случае F_1 закрывает путь протонам, которые при отсутствии F_1 могут свободно проходить через протонный канал.

Строение фактора сопряжения F_0

У большинства известных H^+ -АТФ-синтаз растительного, животного и бактериального происхождения мембранный фрагмент F_0 состоит из полипептидных цепей трех типов: *a*, *b*, *c*. Субъединиц типа *a* и *b* – по одной или по две, субъединиц *c* (более мелких) – от 9 до 12 копий. Субъединицы *a* – гидрофобные, полностью погружены в мембрану, *b* – частично гидрофобные, один участок погружен, остальная часть выступает и закрепляется за субъединицу δ (F_1). Субъединица *c* – небольшой белок, состоящий из двух гидрофобных спиралей, соединенных гидрофильной петлей, ориентированной в сторону F_1 [7]. Ансамбль этих субъединиц формирует протонный канал, по которому протоны проходят в F_1 . Все субъединицы F_0 неподвижны и входят в статорную часть H^+ -АТФ-синтазы.

Строение фактора сопряжения F_1

Это водорастворимый фрагмент, представляющий собой белковый комплекс, который состоит из девяти субъединиц пяти типов: α , β , γ , δ и ϵ . Одна молекула фермента содержит три одинаковые α - и три одинаковые β -субъединицы, а также по одной субъединице γ , δ и ϵ . Функции двух последних еще недостаточно изучены. Согласно современным данным, δ -субъединица выполняет сопрягающую функцию между β - и γ -субъединицами, а ϵ -субъединица – сопрягающую и регуляторную. Ансамбль $\alpha_3\beta_3$ имеет вид приплюснутого шара. Полипептидные цепи α - и β -субъединиц

гомологичны и уложены в похожие по своему пространственному строению белковые глобулы. Подобно плотно уложенным долькам апельсина, все субъединицы α и β расположены попеременно вокруг протяженной субъединицы γ , находящейся в центре молекулы F_1 и имеющей вид стержня [5,7]. Субъединица δ располагается на внешней стороне F_1 , а ϵ (липидной природы) – внутри ансамбля. Субъединицы γ и ϵ подвижны и вращаются вокруг неподвижного ансамбля $\alpha_3\beta_3$. Они представляют собой роторную часть H^+ -АТФ-синтазы. Расшифровка F_1 сделана Джеймсом Уокером (Нобелевская премия, 1997 г.) [7].

Работа H^+ -АТФ-синтазы

Центры связывания АТФ и АДФ и Φ_n находятся на субъединице β на стыке с α -субъединицами. Но известно, что только β -субъединицы выполняют каталитические функции синтеза и гидролиза АТФ.

Работа H^+ -АТФ-синтазы связана со структурными перестройками, в ходе которых изменяется состояние каталитических β -субъединиц. Каждая из субъединиц может поочередно находиться в одном из трех конформационных состояний, различающихся по степени сродства молекул АТФ, АДФ и Φ_n к каталитическому центру. Эти состояния схематически показаны на рис. 12.3.

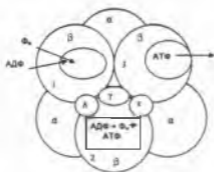


Рис. 12.3. Схема, иллюстрирующая энергозависимые изменения состояний каталитических центров. 1β – слабое связывание АДФ и Φ_n ; 2β – реакция между АДФ и остатком фосфорной кислоты; 3β – выход АТФ [1, 5]

Состояние 1 – каталитический центр субъединицы β открыт, в этом состоянии молекулы АДФ и Φ_n связываются и сравнительно слабо удерживаются активным центром субъединицы β .

Состояние 2 – каталитический центр закрыт: молекулы АДФ и Φ_n прочно удерживаются каталитическим центром. В этом состоянии из связанных молекул АДФ и Φ_n может образоваться АТФ, прочно удерживаемый каталитическим центром фермента.

Состояние 3 – связь молекулы АТФ с каталитическим центром ослаблена, молекула АТФ диссоциирует в раствор.

Переходы между состояниями 1→2→3 происходят в результате энергозависимых структурных перестроек H^+ -АТФ-синтазы, которые осуществляются за счет энергии внешнего источника – $\Delta\mu H^+$. Эти перестройки имеют кооперативный характер – они одновременно затрагивают состояния всех трех каталитических субъединиц β , входящих в состав H^+ -АТФ-синтазы. Это означает, что все три субъединицы находятся в данный момент только в одном из возможных состояний. Структурные особенности строения молекулы F_1 давно делали весьма привлекательной гипотезу о том, что работа H^+ -АТФ-синтазы связана с механическими движениями ее отдельных частей. Каталитическая активность H^+ -АТФ-синтазы связана с вращением ее ротора. Считается, что поворот субъединицы γ вызывает одновременное изменение конформации всех трех субъединиц β , что сопровождается входом их активных центров в одно из трех возможных состояний и обеспечивает работу фермента. Вращение же ротора происходит за счет потока протонов по каналу F_0 . Японскими учеными было показано, что действительно происходит вращение $\alpha_3\beta_3$ комплекса с помощью движения γ -субъединицы по часовой стрелке – при синтезе АТФ, против часовой стрелки – при гидролизе АТФ в зависимости от направления движения протонов через F_0 [7].

Структурные перестройки фермента, вызывающие изменения сродства молекул АТФ, АДФ и Φ_n к каталитическим субъединицам в ходе функционирования H^+ -АТФ-синтазы, происходят в результате электростатических взаимодействий, инициированных процессами протонирования (присоединение протона) и ионизации

кислотных групп аминокислотных остатков, входящих в состав фактора сопряжения F_1 .

Протонирование этих групп может происходить за счет достаточно высокой концентрации ионов водорода со стороны сопрягающей мембраны, где находится канал F_0 , подводящий ионы водорода к F_1 . Если с противоположной стороны мембраны, куда обращена молекула F_1 , концентрация H^+ ниже, чем со стороны F_0 , то в эту область могут диссоциировать протоны от кислотных групп аминокислотных остатков F_1 . В результате этого протоны из области с высоким протонным потенциалом будут проходить через F_1F_0 -комплекс на другую сторону сопрягающей мембраны, обеспечивая попеременное протонирование и депротонирование функционально важных групп фермента. Перенос протонов через F_0F_1 -комплекс может происходить также под действием электрического поля при наличии разности потенциалов на сопрягающей мембране. До тех пор, пока за счет работы цепи электронного транспорта (дыхательная цепь ферментов) на мембране будет поддерживаться поток протонов через H^+ -АТФ-синтазный комплекс, циклический процесс протонирования и депротонирования функциональных групп фермента будет повторяться многократно, обеспечивая тем самым синтез новых молекул АТФ.

С помощью специфического фермента, получившего название АТФ/АДФ-транслоказы и расположенного трансмембранно на внутренней мембране митохондрий, АТФ транспортируется в цитоплазму в обмен на АДФ. В цитоплазме АТФ используется для совершения различного вида работ: биосинтез, различные движения, секреция и т.п.

12.4. Фотосинтез

Живые клетки располагают несколькими источниками энергии. Так, животные и большинство бактерий могут использовать для энергообеспечения как дыхание, так и гликолиз. В клетках растений и фотосинтезирующих бактерий к этим двум процессам добавляется еще и фотосинтез.

Согласно современным представлениям, фотосинтез состоит из ряда фотофизических и биохимических процессов, в результате которых за счет энергии солнечного света синтезируются углево-

ды. Стадии фотосинтеза принято делить на две большие группы процессов – световую и темновую фазы фотосинтеза.

Световая фаза фотосинтеза – совокупность процессов, в результате которых за счет энергии света синтезируются молекулы АТФ и происходит образование восстановленного НАДФ. Световые процессы фотосинтеза протекают в тилакоидах грана хлоропластов растений или на фотомембранах бактерий, которые содержат основные компоненты фотосинтезирующего аппарата – светособирающие пигмент-белковые и электрон-транспортные комплексы, а также АТФ-синтазный комплекс (подобный митохондриальному).

В фотосинтетических системах как растительного, так и бактериального происхождения единым структурно-функциональным звеном фотосинтетического аппарата является фотосистема, которая включает в себя светособирающую антенну, фотохимический реакционный центр и связанные с ним молекулы – переносчики электрона.

Светособирающая антенна представляет собой махромолекулярный комплекс, предназначенный для эффективного улавливания света. В хлоропластах антенный комплекс содержит до нескольких сотен молекул хлорофиллов *a* и *b* и некоторое количество каротиноидов, прочно связанных с белком. Ансамбль ферментов за счет своих достаточно больших размеров эффективно улавливает солнечный свет и направляет его энергию к фотохимическому реакционному центру.

Фотохимический реакционный центр имеет различный пигментный состав у разных фототрофов. У растений в него входит димер хлорофилла *a*, который выполняет роль ловушки энергии возбуждения от светособирающей антенны. Кроме димера хлорофилла, в реакционный центр входят молекулы первичного и вторичного акцепторов электронов, а также первичный донор электронов. Возбужденный хлорофилл обладает низким сродством к электрону и с легкостью отдает его первичному акцептору. В результате очень быстрого переноса электрона от возбужденного хлорофилла к первичному акцептору происходит разделение зарядов в реакционном центре. При этом образуется сильный восстановитель – первичный акцептор (A^{\cdot}) и сильный окислитель – хлорофилл (P^{\cdot}). Молекулы P^{\cdot} и A^{\cdot} расположены в мембране асимметрично: в хлоропластах реакционный центр P^{\cdot} находится ближе

к поверхности мембраны, обращенной внутрь тилакоида, а акцептор А расположен ближе к внешней стороне. Поэтому в результате фотоиндуцированного разделения зарядов на мембране возникает разность электрических потенциалов $\Delta\phi$.

12.4.1. Цепь электронного транспорта хлоропластов

В хлоропластах высших растений и цианобактерий имеются две фотосистемы: фотосистема 1 (ФС1) и фотосистема 2 (ФС2), различающиеся по составу белков, пигментов и оптическим свойствам. У растений светособирающая антенна ФС1 поглощает свет с длиной волны 700-730 нм, а ФС2 – с длиной волны 680-700 нм.

Две фотосистемы связаны между собой посредством цепи электронных переносчиков. ФС2 является источником электронов для ФС1. Иницируемое светом разделение зарядов в фотореакционных центрах ФС2 обеспечивает перенос электрона от воды, разлагаемой под действием света в ФС2, к конечному акцептору – молекуле НАДФ. Цепь электронного транспорта (ЦЭТ), соединяющая две фотосистемы, включает в себя в качестве переносчиков электронов молекулы феофитина (первичный акцептор), пластохинона (вторичный акцептор), отдельный электронтранспортный белковый комплекс (*b/f*-комплекс) и водорастворимый белок пластоциан (P_c). Пластохинон выполняет роль подвижного переносчика двух электронов и двух протонов: покинув ФС2, молекула восстановленного пластохинона может легко перемещаться внутри тилакоидной мембраны, обеспечивая связь ФС2 с другими электронтранспортными комплексами [6].

Окисленный реакционный центр ФС2 обладает исключительно высоким сродством к электрону, то есть является очень сильным окислителем. Благодаря этому в ФС2 происходит разложение воды – химически устойчивого соединения. Входящий в состав ФС2 водорасщепляющий комплекс (ВРК) содержит в своем активном центре ионы марганца, которые служат донорами электронов для реакционного центра ФС2:



Образующиеся протоны попадают во внутритилакоидное пространство хлоропласта. Молекула восстановленного пластохинона диффундирует внутри липидного бислоя тилакоидной мембраны к b/f -комплексу, связывается с ним и отдает ему два электрона, протоны поступают внутрь тилакоида. В свою очередь b/f -комплекс служит донором электрона для P_c . Пластоциан выполняет роль связующего звена между ФС2 и ФС1. От восстановленного P_c электрон поступает к окисленным реакционным центрам ФС1. Таким образом, в результате совместного действия ФС1 и ФС2 два электрона от молекулы воды, разлагаемой в ФС2, через цепь электронного транспорта переносятся в конечном итоге на молекулу НАДФ⁺, обеспечивая образование сильного восстановителя НАДФН.

12.4.2. Сопряжение электронного транспорта с синтезом АТФ

В нормальных условиях функционирования хлоропластов большая часть энергии, выделяющейся в ходе электронного транспорта, используется для работы АТФ-синтазы и образования АТФ.

Важнейшую роль в обеспечении энергетического сопряжения в мембранах тилакоидов, как и во всех остальных энергообразующих органеллах (митохондрии, хромофоры фотосинтезирующих бактерий), играют процессы протонного транспорта. Избыток протонов внутри тилакоида создает протонный градиент $\Delta\mu H^+$, используемый для синтеза АТФ. Строение и работа АТФ-синтазного комплекса аналогичны таковым в митохондриях.

Продуктами световой стадии фотосинтеза становятся два макроэргических соединения: АТФ и НАДФН. Энергия этих соединений необходима для темновых реакций фотосинтеза, которые протекают в строме хлоропласта.

12.4.3. Темновые реакции фотосинтеза

Темновыми реакциями фотосинтеза обычно называют совокупность биохимических реакций, в результате которых происходит усвоение углекислого газа и образование углеводов. Цикл биохимических превращений, приводящих к синтезу органических соединений из CO_2 и воды, по фамилиям авторов, внесших решающий вклад в исследование этих процессов,

называется циклом Кальвина-Бенсона. В отличие от электрон-транспортных и АТФ-синтазного комплексов, которые находятся в тилакоидной мембране, ферменты, катализирующие темновые реакции фотосинтеза, находятся в строме хлоропласта.

В результате превращений в цикле Кальвина-Бенсона из трех молекул CO_2 и воды в хлоропластах образуется молекула глицеральдегид-3-фосфата, при этом расходуются три молекулы АТФ и две молекулы НАДФН. Первичным акцептором углекислого газа становится рибулозо-1,5-дифосфат, карбоксилирование и одновременное расщепление которого дает две молекулы 3-фосфоглицериновой кислоты, которая восстанавливается в глицеральдегид-3-фосфат с помощью НАДФН. Основная часть глицеральдегид-3-фосфата используется для регенерации рибулозо-1,5-дифосфата, другая часть – для синтеза глюкозы в реакциях глюконеогенеза.

ГЛАВА ТРИНАДЦАТАЯ **ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОЦЕССОВ МЕТАБОЛИЗМА** **УГЛЕВОДОВ, ЛИПИДОВ И БЕЛКОВ**

13.1. Взаимосвязь процессов метаболизма

Энергетический катаболизм в большинстве клеток в основном связан с расщеплением моносахаридов (глюкозы). Сопряжение путей окисления и синтеза происходит через амфиболические (сопрягающие, общие) пути, направление процессов осуществляется по соотношению главных аллостерических регуляторов: АТФ, АДФ, АМФ. Важную сопрягающую роль играют метаболиты, способные проникать через внутриклеточные мембраны, такие как цитрат, малат, глицеролфосфат, диоксиацетонфосфат. За счет их движения из цитозоля в матрикс митохондрий и обратно осуществляются челночные механизмы, направляющие метаболические превращения различных веществ внутри клеток. Метаболизм глюкозы в животных клетках имеет две наиболее важные особенности. Первая из них – запасание в виде гликогена. Скорость гликолиза в клетках может оказаться очень высокой, и запас гликогена, например, в мышечных клетках быстро истощается. Таким образом, необходимо существование механизмов быстрого включения

и выключения гликолиза, ресинтеза глюкозы из лактата, пирувата и ряда аминокислот.

В клетках высших животных запас гликогена в мышцах пополняется за счет поступления глюкозы из крови, куда она, в свою очередь, попадает из кишечника или гепатоцитов (при расщеплении гликогена). Вторая особенность метаболизма глюкозы состоит в том, что большинство клеток как высших животных организмов, так и растительных и бактериальных получают практически всю необходимую энергию за счет ее окисления. Поэтому для высших животных уровень глюкозы в крови является одним из важнейших параметров гомеостаза и не должен падать ниже 3 мМ/л.

В процесс гликолиза иногда вовлекаются и другие сахараиды, кроме глюкозы. D-манноза и D-фруктоза фосфорилируются в шестом положении под действием относительно неспецифической гексокиназы:



Фруктозо-6-фосфат непосредственно включается в гликолиз на этапе фосфофруктокиназной реакции, а маннозо-6-фосфат изомеризуется под действием специфической изомеразы во фруктозо-6-фосфат:



В печени позвоночных фруктоза может включаться в гликолиз и другим путем. Фермент фруктокиназа фосфорилирует фруктозу по первому атому углерода:



Затем D-фруктозо-1-фосфат с помощью фермента фруктозо-1-фосфатальдолазы расщепляется до D-глицеральдегида и диоксиацетонфосфата:



Свободный D-глицеральдегид подвергается фосфорилированию в D-глицеральдегид-3-фосфат (3-фосфоглицериновый альдегид):



Галактоза, образуемая при расщеплении лактозы на глюкозу и галактозу, включается в гликолиз в результате фосфорилирования с помощью галактокиназы:



Затем D-галактозо-1-фосфат изомеризуется в глюкозо-1-фосфат в несколько этапов. Это превращение требует в качестве кофермента уридинтрифосфат (УТФ).

В гликолиз могут вовлекаться и пентозы за счет образования гликолитических метаболитов в ходе структурной перестройки сахаров.

Глицерин и глицерол-3-фосфат, образующиеся при расщеплении соответственно триглицеридов и фосфоглицеридов, также вовлекаются в гликолитический процесс через фосфорилирование свободного глицерина под действием глицеролкиназы:



Затем глицерол-3-фосфат окисляется либо под действием цитоплазматической глицеролфосфатдегидрогеназы (НАД-зависимой), либо под действием митохондриальной ФАД-зависимой глицеролфосфатдегидрогеназы:



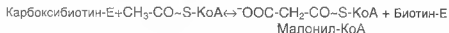
Диоксиацетонфосфат изомеризуется в глицеральдегид-3-фосфат, вступающий в гликолиз.

Наибольшую амфиболическую (сопрягающую) роль выполняет цикл трикарбоновых кислот. Окисление жирных кислот сопрягается с превращением углеводов непосредственно через ацетил-КоА, образующийся в процессе β -окисления жирных кислот. При избыт-

ке ацетил-КоА продукт конденсации его с оксалоацетатом – цитрат – из митохондрий поступает в цитозоль и в эндоплазматической сети превращается в жирные кислоты через образование малонил-КоА. Происходит это следующим образом. Выйдя из митохондрий, цитрат снова в присутствии АТФ и КоА расщепляется на ацетил-КоА и оксалоацетат:



Затем из ацетил-КоА и CO_2 под действием ацетил-КоА-карбоксилазы образуется малонил-КоА. В реакции участвует биотин в качестве кофермента:



Малонил-КоА является исходным соединением для синтеза жирных кислот. Оксалоацетат может служить для образования фосфоенолпирувата и ресинтеза глюкозы в процессах глюконеогенеза:



В цитоплазме оксалоацетат с помощью малатдегидрогеназы может восстанавливаться в малат, который способен вернуться в митохондрию или окислиться с помощью НАДФ-зависимой малатдегидрогеназы, декарбоксилирующей до пирувата:



Пируват далее может поступать в митохондрию для дальнейшего окисления или использоваться для ресинтеза глюкозы, а НАДФН идет на синтез жирных кислот (рис.13.1).

Распад аминокислот чаще всего начинается с переаминирования в соответствующую α -кетокислоту, которая подвергается далее окислительному декарбоксилированию. Именно так в животных клетках превращается аланин, валин, лейцин, изолейцин.

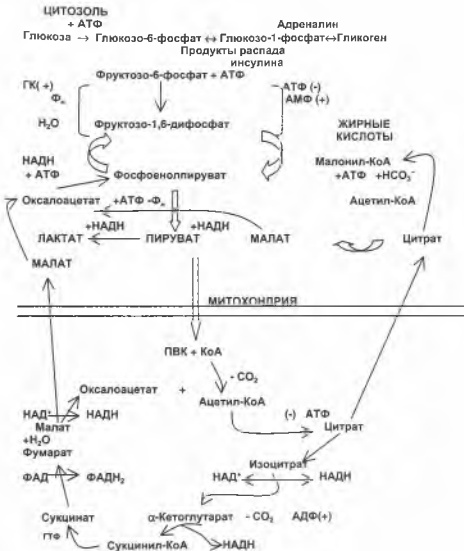


Рис. 13.1. Схема сопряжения процессов окисления и синтеза глюкозы и жирных кислот. ГК – глюкокортикоиды. Плюс – активация, минус – ингибирование [3]

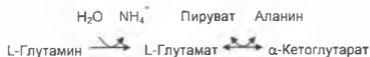
Аланин при переаминировании или дезаминировании дает пируват, который непосредственно превращается либо в ацетил-КоА, либо в глюкозу. К аминокислотам, дающим пируват, относятся также цистеин, серин, глицин, треонин.

Кроме того, пять аминокислот дают ацетил-КоА без промежуточного образования пирувата. К числу таких аминокислот принадлежат ароматические аминокислоты фенилаланин, тирозин, триптофан. Другие же алифатические аминокислоты дают ацил-КоА-производные, которые подвергаются превращению в процессе β -окисления жирных кислот.

Аспарагин и аспарагиновая кислота переходят в оксалоацетат при участии аспарагиназы и трансаминазы:



Глутамин и глутаминовая кислота подобным образом дают α -кетоглутаровую кислоту:



В более сложных превращениях, состоящих из нескольких стадий, в оксалоацетат переходят также пролин, гистидин, аргинин.

Схема включения различных аминокислот в процессы метаболизма представлена на рис.13.2.



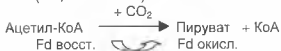
Рис. 13.2. Амфиболические интермедиаты, образующиеся из углеродных скелетов аминокислот [2]

13.2. Регуляция направления метаболических процессов

Регуляция направления метаболических процессов определяется воздействием аллостерических модификаторов на ключевые реакции превращений. Ряд ключевых стадий регулируется также извне с помощью гормонов (рис.13.1).

Внутри клеток ключевым регулируемым ферментом является фосфофруктокиназа. В большинстве клеток метаболические взаимопревращения глюкозо-1-фосфата, глюкозо-6-фосфата, фруктозо-6-фосфата достигают состояния равновесия или приближаются к нему. Фосфорилирование фруктозо-6-фосфата до фруктозо-1,6-дифосфата – практически необратимая реакция, что делает ее

очень далекой от равновесия. Фосфофруктокиназа (ФФК) – фермент, очень чувствительный к аллостерическим регуляторам. ФФК ингибируется высокими концентрациями АТФ, АМФ оказывает активирующее воздействие. Таким образом, уменьшение концентрации АТФ включает гликолиз и окисление пирувата за счет снятия ингибирования с ФФК, цитратсинтетазы и изоцитратдегидрогеназы (рис.13.1). Кроме того, на начальных стадиях фосфорилиза гликогена и при окислении фосфоглицеринового альдегида в гликолизе необходимо присутствие неорганического фосфата. Быстрое потребление АТФ клеткой приводит к увеличению содержания АМФ и Ф_н, что также приводит к ускорению процессов расщепления глюкозы. Однако, если растет концентрация АТФ, блокирование фосфофруктокиназной реакции снижает скорость гликолиза. Снижение скорости гликолиза и стимуляция глюконеогенеза и гликогеногенеза вызывается избытком цитрата, который, поступая из митохондрий в цитоплазму, ингибирует ФФК. Избыток цитрата через образование ацетил-КоА и малонил-КоА превращается в жирные кислоты, что стимулирует липогенез. Таким образом, избыток углеводов в клетках обычно переходит в жиры, как более энергоемкие соединения. Обратный процесс, однако, в клетках высших животных организмов невозможен из-за отсутствия фермента, катализирующего образование пирувата из ацетил-КоА. Такая реакция имеет место у бактерий, где синтез углеводов на основе ацетил-КоА возможен. Для восстановительного карбоксилирования ацетил-КоА обычно используется восстановленный ферродоксин (Fd, Fe-S-белок):



Один из путей синтеза сахаров у бактерий – так называемый «сериновый путь» – является примером сопряжения метаболизма аминокислот и образования углеводов. Это циклический процесс, в ходе которого одна молекула формальдегида, присоединенного к тетрагидрофолиевой кислоте, конденсируясь с CO₂, превращается в ацетат. Регенерирующим субстратом является глиоксилат (рис.13.3).

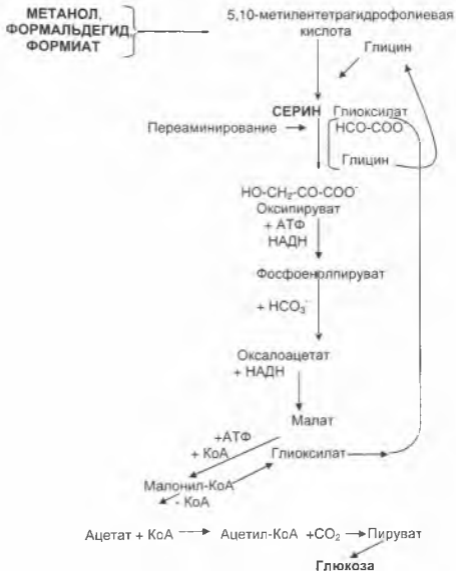


Рис. 13.3. «Сериновый путь» синтеза углеводов [3]

Ограничение на пути превращения C_2 -ацетильных единиц в C_3 -метаболиты преодолевается также у ряда бактерий и растений при помощи глиоксилатного пути (рис. 13.4). Глиоксилатный путь позволяет некоторым бактериям (*E. coli*) использовать ацетат как единственный источник углерода.

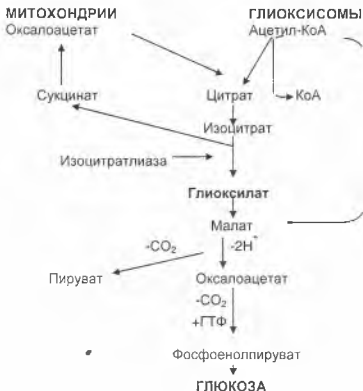


Рис. 13. 4. Глиоксилатный путь синтеза углеводов у растений и некоторых бактерий [1]

В растительных клетках благодаря глиоксилатному пути жиры могут легко превращаться в углеводы, что невозможно в животных клетках. Первую часть глиоксилатного пути (рис.13.4) можно представить как модификацию цикла трикарбоновых кислот, где изоцитрат расщепляется на сукцинат и глиоксилат. Этот участок пути может быть использован для поставки глиоксилата в «серинный путь». Регенерирующим субстратом здесь служит оксалоацетат (верхний цикл рис.13.4). Продолжение пути ведет к синтезу окса-

лоацетата через малатсинтетазную реакцию (конденсация глиоксилата с ацетил-КоА). Полученный в этой реакции малат может превращаться несколькими путями: окисляться до оксалоацетата с последующим декарбоксилированием в присутствии ГТФ в фосфоенолпируват; сразу окисляться с декарбоксилированием в пируват. Фосфоенолпируват и пируват могут быть использованы для глюконеогенеза и образования аминокислот (через переаминирование).

В настоящее время есть мнение, что направление метаболических процессов регулируется через изменение скорости превращения субстратов в так называемых субстратных циклах.

После фосфорилирования фосфофруктокиназой фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат, специфическая фруктозо-1,6-дифосфатаза может осуществить обратный гидролиз фруктозо-1,6-дифосфата во фруктозо-6-фосфат и остаток P_i . Подобный цикл превращений был назван субстратным циклом. Другие субстратные циклы включают превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат и гидролиз глюкозо-6-фосфата в глюкозу и остаток P_i ; синтез и распад гликогена, а также превращение фосфоенолпирувата в пируват и обратно пирувата в фосфоенолпируват через оксалоацетат и малат.

На первый взгляд субстратные циклы кажутся бессмысленной тратой макроэргических связей, однако скорость их в клетках оказывается неожиданно высокой. Было высказано предположение, которое подтверждается теоретическими расчетами [3], что увеличение скорости круговорота веществ в цикле сопровождается значительным усилением ответа на эфффекторы. В присутствии соответствующих аллостерических регуляторов субстраты могут быть направлены в одну или другую стороны, сохраняя небольшую скорость оборота в цикле. Скорость оборота субстрата в цикле может возрастать в патологических или критических ситуациях для увеличения производства тепла. Например, обращение фруктозо-6-фосфата в цикле служит для обогрева летательных мышц шмеля в холодную погоду.

13.3. Взаимное превращение основных питательных веществ в животных клетках

Животные способны накапливать жиры, питаясь исключительно углеводной пищей. Наиболее важной реакцией в этом процессе

является превращение пирувата в ацетил-КоА, который служит исходным соединением для синтеза жирных кислот. Обратное превращение ацетил-КоА в пируват невозможно. Только концевой трехуглеродный фрагмент молекулы жирной кислоты с нечетным числом атомов углерода является потенциальным субстратом для синтеза гликогена, поскольку здесь имеет место образование трехуглеродного соединения – пропионата. Хотя небольшое количество углерода из жирных кислот все же может быть включено в глюконеогенез и гликогеногенез за счет оксалоацетата, который через превращение в малат может выйти из цикла трикарбоновых кислот и, поступив в цитоплазму, превратиться в глюкозу через фосфоенолпируват (рис.13.5).

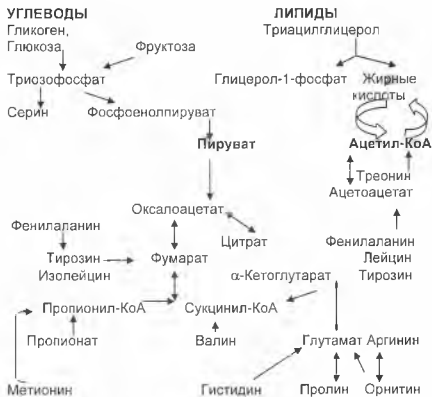


Рис. 13.5. Взаимопревращения углеводов, липидов и аминокислот [2]

Углеродные скелеты ряда заменимых аминокислот могут образоваться из интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Гликогенные аминокислоты, в свою очередь, являются источником глюкозы и гликогена. Кетогенные аминокислоты служат источником ацетоацетата и ацетил-КоА. В клетках животных не существует путей превращения жирных кислот в гликогенные аминокислоты. Использование же последних для синтеза жирных кислот возможно путем образования пирувата и ацетил-КоА или за счет обращения ЦТК на участке от α -кетоглутарата к цитрату. Избыток цитрата превращается в ацетил-КоА через цитратлиазную реакцию, а последний – в жирные кислоты через малонил-КоА. Утилизация аминокислот в жирные кислоты, правда, не имеет существенного значения, за исключением тех животных, которые используют богатую белком пищу.

РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ

ЭЛЕМЕНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Предмет и задачи молекулярной биологии

В отношении статуса молекулярной биологии, ее места в системе биологического знания мнения специалистов существенно различаются. Одни ведущие ученые-биологи считают ее самостоятельной наукой, другие, не менее авторитетные, – лишь частью биохимии. Последние, в частности, при написании учебников биохимии не выделяют специального раздела по молекулярной биологии. Более того, их предметный указатель, как правило, не содержит даже термин «молекулярная биология».

Такое расхождение в подходе к молекулярной биологии частично можно объяснить тем обстоятельством, что она имеет общий с биохимией объект исследования – макромолекулы, прежде всего белки и нуклеиновые кислоты. Однако, например, анатомия и физиология человека имеют тоже общий объект исследования, но никто не протестует против существования самостоятельных наук – анатомии и физиологии человека (даже, как минимум, двух – нормальной и патологической).

Неприятие молекулярной биологии как самостоятельной науки представителями «классической» биохимии может быть обусловлено игнорированием ими того факта, что биохимия и молекулярная биология имеют разный подход и решают разные задачи в отношении общего объекта исследования. На это, в частности, указывает В.А. Энгельгардт. Характерной чертой молекулярной биологии он считает ее трехмерность. "Именно эта способность составляет коренное отличие молекулярной биологии от предшествовавшей ей появлению биохимии. Для последней трехмерное мышление абсолютно чуждо. Это можно хорошо пояснить на таком примере. Крупнейшим из достижений биохимии последнего времени было открытие трикарбонового цикла Кребсом. Оно было заслуженно награждено присуждением ему Нобелевской премии. Вся суть работы Кребса с исчерпывающей полнотой может быть представлена на листке бумаги в двух измерениях – плоским образом. Тем самым требования биохимика оказываются полностью удовлетворенными. Если так обстоит дело с участком, который с полным правом надо рассматри-

вать как одну из вершин достижений биохимии, то в полной мере это же относится и ко всей области обмена веществ, изучение которого и составляет, по существу, основное содержание биохимии.

Исследование коренных биологических проблем приобрело принципиально иной характер, когда был осуществлен прорыв в новую область, в трехмерное пространство. Под знаком трехмерности развиваются все доминирующие линии молекулярно-биологического исследования, этот аспект характеризует все важнейшие успехи и достижения, касаются ли они механизмов наследственной информации и генетического кода, биосинтеза белков или элементарных основ биологического катализа и т.д. Трехмерное начало лежит в основе крупнейшей задачи – познания взаимоотношений между молекулярной структурой и биологическими функциями макромолекул. Этот функционально-структурный подход, так же как и трехмерность, а вернее неразрывное единство с ней, входит в число важнейших специфических черт молекулярной биологии" (Энгельгардт В.А. Познание явлений жизни. М.: Наука, 1984. С.114-115).

Трехмерность предполагает не только, а главное, не столько упорядоченное пространственное расположение атомов в макромолекуле, сколько изменение ее конформации. "Более того, такие перемены конформации биологических макромолекул – важнейшее их свойство, благодаря которому они и могут выполнять свои функции. Именно поэтому и можно говорить, что пространство оказывается важнейшим участником действия на молекулярной сцене жизни" (Энгельгардт В.А. Там же. С.148).

Однако и трех измерений для молекулярной биологии недостаточно. "При переходе к высшим организмам сразу выступает проблема дифференциации, т.е. последовательного усложнения живого объекта в процессе развития. <...>. Из одной-единственной клетки возникает организм со всем его бесчисленным многообразием неотъемлемых частей – органов, тканей, клеток, процессов и веществ, с приматом строжайше предначертанной организации. <...> в поисках законов и механизмов дифференциации, придет в действие еще одно, уже четвертое измерение – время, поскольку процесс развития развертывается с неумолимой последовательностью во времени. Мы должны быть готовыми к тому, что тут придется встретиться с совершенно новыми задачами, во многом не находящими своих оснований в привычных достижениях молекулярной биологии" (Энгельгардт В.А. Там же. С.138).

Приведенные высказывания одного из пионеров молекулярной биологии (в прошлом – директора Института молекулярной биологии

АН СССР) можно дополнить, опираясь на особую роль нуклеиновых кислот и белков в биосистемах. В отличие от малых молекул, белок и нуклеиновые кислоты представляют собой «работающие» молекулы, своего рода «молекулярные машины». Они составляют структурно-функциональную основу живых систем, принимают участие во всех жизненных процессах, направляя их по определенным руслам, практически не изменяя при этом свое химическое строение. Белки и нуклеиновые кислоты клетки не являются расходуемым в процессе своего функционирования материалом, их рабочие циклы являются обратимыми, многократно повторяемыми. Они, подобно металлообрабатывающему станку, превращают исходный материал в готовый продукт, не отдавая ему ни одной частицы своего «тела».

Основной задачей молекулярной биологии, по мнению В.А.Энгельгардта, является выяснение связи между важнейшими проявлениями жизнедеятельности и структурой молекул, прежде всего белков и нуклеиновых кислот. Она изучает механизмы проявления элементарных жизненных функций этими молекулами.

Белки и нуклеиновые кислоты в живых системах выполняют свои специфические функции. Характерно, что важнейшие функции белков реализуются, как правило, на уровне отдельных молекул. К числу функций белков относятся:

1) каталитическая; ферменты в живой природе осуществляют все реакции обмена веществ, распада одних соединений и синтеза других;

2) структурная; она представлена прежде всего мембранами, обеспечивающими определенную локализацию различных веществ и биохимических процессов внутри клетки. Мембраны регулируют прохождение различных веществ внутрь органелл, создают активный транспорт молекул, идущий с затратой энергии. В специализированных клетках высших организмов некоторые структурные белки (коллаген, склеропротеин роговицы глаза и др.) присутствуют в значительных количествах, образуя специальные типы тканей;

3) механохимическая; присуща как отдельным внутриклеточным структурам, так и специализированным надклеточным образованиям;

4) транспортная; существуют белки-переносчики, которые обратимо связывают определенные вещества и переносят их к месту использования (или выделения). К таким белковым молекулам, в частности, относится гемоглобин;

5) защитная; специальные белки организма обеспечивают защиту его от чужеродных веществ и клеток. Представлены сложными белками – иммуноглобулинами плазмы крови, синтезируемыми клетками лимфоидной ткани.

Нуклеиновые кислоты являются материальным носителем наследственности и выполняют кибернетические функции. Молекулы ДНК способны к редупликации (самовоспроизведению) и транскрипции – синтезу молекул РНК на соответствующих участках ДНК. Под контролем молекул РНК на рибосомах происходит трансляция – биосинтез белков. Все эти процессы протекают с участием различных белковых молекул, при их взаимодействии с нуклеиновыми кислотами.

Молекулярная биология развилась на широком фундаменте физико-химической биологии, возникшей еще в начале XX столетия. Велика заслуга в ее становлении Н.К. Кольцова, которому принадлежат такие основополагающие представления, как «наследственные молекулы» и матричный синтез (20-30-е годы). Однако как самостоятельная научная дисциплина молекулярная биология заявила о себе лишь в 60-х годах после расшифровки генетического кода. С тех пор в области молекулярной биологии были достигнуты большие успехи, она стала теоретической основой генетической инженерии и биотехнологии в целом; в ней сформировались такие направления, как молекулярная биология гена, клетки, вирусов и др. В текущем году исполняется 50 лет с момента открытия структуры двойной спирали молекулы ДНК (1953). Этот юбилей ознаменован расшифровкой генома человека. Однако это не значит, что расшифрован биологический смысл выявленной последовательности нуклеотидов. Получен лишь исходный материал для дальнейшей сложной работы. По-прежнему не известен код, которым «зашифрована» программа индивидуального развития многоклеточных животных, и механизм его реализации. Молекулярную биологию ожидают поражающие воображение открытия, которые сразу же будут востребованы практикой. В целом же не так важно, считать ли молекулярную биологию самостоятельной наукой или одним из разделов биохимии. Ведь все биологические дисциплины, в конечном счете, сами являются разделами единой науки о живом – биологии. Главное – то, что молекулярная биология имеет свое «лицо»: специфические подходы и особые цели исследования.

В настоящем разделе даются краткие сведения о молекулярных механизмах ферментативного катализа, матричных синтезов, мышечного сокращения, структурно-функциональной организации и работе биомембран.

ГЛАВА ЧЕТЫРНАДЦАТАЯ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

14.1. Общие сведения о катализе

Катализом называется явление, при котором наличие в системе какого-либо вещества вызывает или ускоряет протекание некоторой химической реакции, причем состояние и количество этого вещества в конце реакции остается неизменным. Такое вещество называют **катализатором**.

На практике нередко происходит постепенное изменение каталитических свойств катализатора, однако оно не связано с основной каталитической реакцией, а представляет собой какой-то иной (побочный) процесс.

В зависимости от агрегатного состояния участников химической реакции катализ может быть гомогенным или гетерогенным; соответственно и катализаторы подразделяют на гомогенные и гетерогенные. Гомогенные катализаторы образуют единую фазу с реагирующими веществами. При гетерогенном катализе химическая реакция идет на границе раздела фаз, образуемых катализатором и реагирующими веществами. Поверхность гетерогенных катализаторов часто обладает свойствами полупроводимости, а сами эти катализаторы являются полупроводниками.

На предприятиях химической промышленности применяются катализаторы небиологической природы.

Многие реакции при гомогенном катализе ускоряются такими ионами, как Fe^{2+} , Fe^{3+} , I^- , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, WO_4^{2-} , MoO_4^{2-} и другими; ионы водорода и гидроксиды ускоряют этерификацию кислот и спиртов, гидролиз сложных эфиров, инверсию сахаров и т. д. (кислотно-основной катализ).

При гетерогенном катализе используются ванадиевые (получение бутадиена из этанола), платино-родиевые (окисление аммиака в оксиды азота), серебряные (окисление этилена в оксид этилена, метанола в формальдегид), никелевые (отверждение жиров), алюмосиликатные (крекинг углеводородов) и другие катализаторы. Гетерогенный катализ обладает высокой эффективностью.

Биохимические реакции ускоряются катализаторами биологической природы – ферментами (энзимами). Ферменты функционируют либо в растворах, либо в надмолекулярных структурах. В растворе белок-фермент и малые молекулы субстратов находятся в одной

фазе (жидкой), между ними имеется строгая стехиометрия взаимодействия (например, одна глобула белка взаимодействует с одной молекулой субстрата), поэтому такой ферментативный катализ может быть отнесен к гомогенному катализу. Однако сорбция субстратов и биохимическая реакция протекают на некоторой поверхности большой молекулы белка, к тому же нередко связанной с надмолекулярной структурой (например мембраной). В этом смысле ферментативный катализ сходен с гетерогенным.

Катализатор лишь ускоряет химическую реакцию. Он не может осуществить термодинамически невозможную реакцию. Если реакция обратима, катализатор увеличивает в равной мере константы скоростей как прямой, так и обратной реакций и не смещает положения равновесия. Как и небиологический катализатор, фермент с молекулами реагирующих веществ образует промежуточное соединение, обладающее высокой реакционной способностью, из которого после завершения реакции фермент освобождается и участвует в новых актах реакции.

Однако фермент, будучи биологическим катализатором, обладает рядом особенностей, выработавшихся в процессе биологической эволюции: он работает обычно в «мягких» условиях (при невысоких температурах, давлениях и значениях рН, как правило, близких к нейтральным); обладает высокой специфичностью; характеризуется более высокой, чем небиологические катализаторы, эффективностью; является катализатором с регулируемой активностью, что наиболее полно проявляется у аллостерических ферментов.

Следует отметить, что ферменты как и небиологические катализаторы ускоряют как прямую, так и обратную реакции, что было бесспорно доказано в экспериментах с различными ферментными препаратами (гликозидазами, липазами, пептидазами, фосфорилазами и др.). Однако, в соответствии со спецификой функционирования биосистем, в большинстве случаев ферментативный синтез не только сложных, но и сравнительно простых соединений в живой клетке осуществляется не теми ферментами, которые катализируют их расщепление, а иными ферментами и ферментными системами.

14.2. Методы исследования молекулярного механизма ферментативного катализа

Способность полипептидов избирательно ускорять химические реакции, по-видимому, была первой функцией, востребованной у данного класса соединений формирующимися примитивными био-

системами. Без этого свойства, проявившегося у полипептидов и получившего дальнейшее развитие у белковых молекул всех организмов, наша планета осталась бы безжизненным небесным телом. И в настоящее время, когда белковые молекулы выполняют целый ряд иных функций, каталитическая функция белков продолжает оставаться ведущей.

Ускорение химических реакций, осуществляемое ферментами, достигает значений, в 10^{15} - 10^{20} раз превышающих скорости тех же реакций в отсутствие катализатора. Молекулярный механизм ферментативного катализа, обеспечивающий такое колоссальное ускорение химических реакций, естественно вызывает обоснованный интерес у ученых.

Поскольку в связи с ничтожными размерами участников ферментативной реакции непосредственно наблюдать их взаимодействие в этом процессе не представляется возможным, молекулярный механизм ферментативного катализа изучают косвенными методами. Для этой цели используют методы ферментативной кинетики, рентгеноструктурный анализ, спектрофотометрию, спектрополяризацию, люминесцентный анализ, радиоспектроскопию (спектры ЭПР и ЯМР) и др., а также термодинамический подход.

Обязательным условием проявления каталитического действия фермента является образование фермент-субстратного комплекса (ФСК). Согласно модельной теории индуцированного структурного соответствия фермента и субстрата, предложенной в 1958 г. Д. Кошландом, при образовании ФСК проявляется конформационная лабильность взаимодействующих молекул.

Субстрат при своем проникновении в активный центр фермента вызывает (индуцирует) изменение геометрии последнего, необходимое для каталитического действия. Возможны случаи, когда изменяется конформация субстрата, а не фермента, или конформации и того и другого одновременно.

Современные инструментальные методы анализа подтверждают наличие конформационных превращений ферментов при их взаимодействии с субстратами. Некоторые из ферментов в присутствии субстратов становятся более жесткими, другие, напротив, более лабильными, что проявляется в ускорении тепловой денатурации. Изменения конформации ферментов при взаимодействии с субстратами вызывают изменение спектров поглощения и люминесценции. Методами спектрополяризации были установлены изменения α -спиральности в молекуле ферментов, возникающие при их взаимодействии с субстратами и коферментами. О конформационных

изменениях в ФСК свидетельствуют спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) ферментов, содержащих парамагнитные метки, спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Изменения конформации активного центра при взаимодействии с субстратом были подтверждены в ряде случаев методами рентгеноструктурного анализа путем сопоставления пространственных структур фермента и ФСК. Эти изменения представляют собой небольшие смещения определенных связывающих групп.

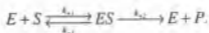
Определенное представление о молекулярном механизме ферментативного процесса дают результаты химической модификации ферментов, а также использование аналогов субстратов.

Все названные методы однако дают лишь фрагментарные сведения об определенных ферментах. Более универсальным подходом к раскрытию механизмов ферментативного процесса является исследование кинетики ферментативных реакций.

14.3. Элементы ферментативной кинетики

Раздел энзимологии, посвященный изучению скорости ферментативных реакций и зависимости ее от различных факторов (концентраций фермента и субстрата, температуры, pH и т. д.), называется ферментативной кинетикой.

Английский химик А. Броун и французский ученый В. Анри, изучавшие ферментативные реакции, в 1902 г. независимо друг от друга выдвинули обоснованное предположение, что фермент E , катализирующий превращение субстрата S в продукт P , первоначально образует с субстратом промежуточное соединение ES , которое затем распадается с освобождением свободного фермента и продукта. В. Анри дал количественную математическую трактовку этого процесса, а Л. Михаэлис и его сотрудница М. Мёнтен в 1913 г. подтвердили и развили представления В. Анри применительно к односубстратной односторонней реакции вида:



Исходя из принципа стационарности ($d[ES]/dt = 0$), они вывели уравнение, отражающее зависимость скорости v ферментативной

реакции от концентраций фермента и субстрата, которое после уточнения Д. Холдейном и Д. Бриггсом приняло следующий вид:

$$v = k_{+2}[E_0][S]/(K_m + [S]) = V[S]/(K_m + [S]),$$

где $[E_0]$ – концентрация фермента (суммарная для свободной E и связанной с субстратом ES форм: $[E_0] = [E] + [ES]$); $K_m = (k_{-1} + k_{+2})/k_{+1}$ – константа Михаэлиса; $V = k_{+2}[E_0]$ – максимальная скорость реакции (при $[S] \gg K_m$).

Поскольку $V = -(d[S]/dt)_{\max} = k_{+2}[E_0]$,

то $k_{+2} = V/[E_0] = -(d[S]/dt)_{\max}/[E_0]$ выражает максимальное число молекул субстрата, превращаемых в продукт одной молекулой фермента в единицу времени. Оно называется молярной активностью фермента, или его «числом оборотов» с размерностью мин^{-1} .

Легко показать, что константа Михаэлиса численно равна концентрации субстрата, при которой $v = 0,5V$

Это уравнение находится в согласии с наблюдаемой в опытах зависимостью v от $[E_0]$ и $[S]$ (рис. 14.1), что подтверждает правомерность высказанного ранее предположения о промежуточном фермент-субстратном комплексе и его превращениях.

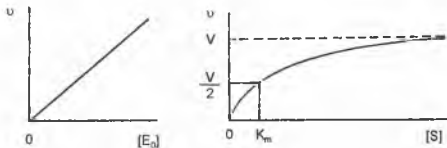


Рис. 14.1. Зависимость скорости односторонней односубстратной реакции от концентраций фермента и субстрата

Существует несколько способов линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен, благодаря которой оно на графике выглядит в виде прямой линии. Так, если на осях координат отложить значения не v

и $[S]$, а обратных им величин ($1/v$ и $1/[S]$), то получим прямолинейную зависимость $1/v$ от $1/[S]$ (рис. 14.2). Ей соответствует уравнение Лайнуивера-Берка:

$$1/v = (K_m/V)(1/[S]) + 1/V.$$

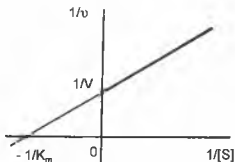


Рис. 14.2. Зависимость $1/v$ от $1/[S]$ для односторонней односубстратной реакции

Уравнение Михаэлиса-Ментен послужило основой для составления аналогичных уравнений для односубстратных двухсторонних, двух- и трехсубстратных реакций, а также для различных случаев ингибирования ферментативной активности. Графически все эти зависимости в осях $1/v - 1/[S]$, как правило, представлены в виде прямых линий. Однако взаимное расположение линий в случае двухсубстратных реакций (при фиксированных значениях концентрации одного из субстратов) и в случае с обратимым ингибированием (при фиксированных значениях концентраций ингибитора) различается в зависимости от характера взаимодействия участников реакции с ферментом. Так, для неупорядоченного механизма двухсубстратной реакции с взаимонезависимым присоединением субстратов А и В к ферменту (когда они, не влияя друг на друга, могут присоединяться в любой последовательности) характерно пересечение прямых на оси абсцисс (рис. 14.3).

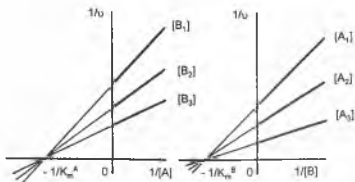
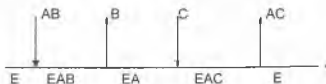


Рис. 14.3. Зависимость скорости двухсубстратной реакции с неупорядоченным взаимонезависимым механизмом присоединения субстратов А и В; K_m^A и K_m^B – константы Михаэлиса для субстратов А и В

В случае взаимозависимого неупорядоченного механизма (когда присоединение молекулы одного субстрата к ферменту облегчает присоединение молекулы другого субстрата) и упорядоченного механизма (когда субстраты присоединяются к ферменту в строгой последовательности, например, вначале А, а затем В) прямые пересекаются в третьем квадранте. Этот вариант протекания реакции изображают в виде схемы Келланда



Для механизма «пинг-понга», изображаемого на схеме Келланда в виде



линии на графике располагаются параллельно друг другу (В и АС – соответственно промежуточный и конечный продукты реакции).

Таким образом, кинетический анализ двухсубстратных реакций позволяет выявить существенные моменты функционирования фермента (порядок присоединения к нему субстратов; наличие кооперативного эффекта при связывании субстратов с ферментом; последовательность отделения продуктов В и АС от фермента в ходе реакции с механизмом «пинг-понга» и др.).

Аналогичным образом обстоит дело и с кинетикой ингибирования ферментативных реакций. Ингибиторы как вещества, специфически понижающие скорость определенных ферментативных реакций, обладают как необратимым, так и обратимым действием. Кроме того, ингибирование бывает с полным (когда присоединение ингибитора к ферменту полностью лишает его активности) и частичным (когда активность снижается частично) эффектом.

Наибольший интерес представляет обратимое ингибирование, среди различных видов которого отметим конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное.

Конкурентное ингибирование обусловлено обратимым присоединением молекулы ингибитора к активному центру фермента (вместо молекулы субстрата). При неконкурентном ингибировании молекула ингибитора обратимо присоединяется за пределами активного центра фермента и не препятствует связыванию с ним субстрата, но замедляет (или делает невозможным) превращение последнего в продукт. Наиболее часто при бесконкурентном ингибировании молекула ингибитора присоединяется к ФСК.

При конкурентном ингибировании графики, построенные в осях $1/v - 1/[S]$, пересекаются в точке, расположенной на оси ординат, а при неконкурентном ингибировании с полным эффектом торможения – на оси абсцисс (рис. 14.4).

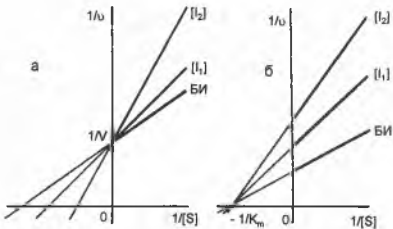


Рис. 14.4. Влияние различных концентраций конкурентного (а) и неконкурентного (б) ингибиторов на скорость односубстратной односторонней ферментативной реакции ($[I_2] > [I_1]$; БИ – без ингибитора)

При бесконкурентном ингибировании, когда образующийся фермент-субстрат-ингибиторный комплекс (ESI) не распадается с образованием продукта, графики для различных концентраций ингибитора располагаются параллельно друг другу.

Особый интерес представляет субстратное ингибирование. Суть его состоит в том, что по мере повышения концентрации субстрата происходит непрерывное снижение эффективности ферментативного превращения этого субстрата в продукт. Вначале происходит замедленное (по сравнению с отсутствием ингибирования) нарастание скорости реакции с увеличением концентрации субстрата, а начиная с некоторого значения $[S_{опт}]$ скорость начинает снижаться (рис. 14.5). Специфическая форма графиков, построенных по данным эксперимента, позволяет выявить наличие субстратного торможения, а соответствие математической модели $v = f([S])$ форме этих графиков указывает на возможный молекулярный механизм торможения.

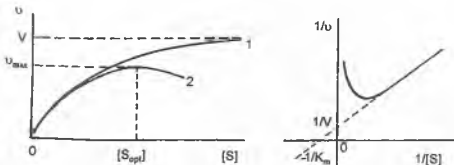
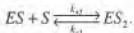


Рис. 14.5. Зависимость скорости односторонней односубстратной реакции от концентрации субстрата в случае субстратного торможения (2) и при отсутствии его (1); $V = k_{+2}[E_0]$

Полагают, что в случае субстратного торможения наряду с рассмотренной ранее реакцией, ведущей к образованию фермент-субстратного комплекса и продукта P , протекает обратимая реакция



Комплекс ES_2 не способен давать продукт, он уменьшает фактическую концентрацию фермента, принимающего участие в образовании продукта, снижая тем самым эффективность работы фермента.

Исходя из модели одновременного протекания двух названных реакций, было выведено уравнение скорости реакции:

$$v = V[S]/(K_m + [S] + [S]^2 / K_S),$$

где $K_S = k_{-3} / k_{+3}$.

Ему соответствует форма графиков, представленных на рис. 14.5. Такого рода механизм субстратного торможения может быть в том случае, если молекула фермента имеет два контактных участка, к которым присоединяется молекула субстрата при образовании комплекса ES . С повышением концентрации субстрата воз-

растает вероятность образования комплекса ES_2 (рис. 14.6), не способного давать продукт. Это тормозящее влияние избытка молекул субстрата проявляется в приведенном уравнении через выражение $[S]^2 / K_S$.

Анализ уравнения позволяет найти оптимальное значение концентрации субстрата, при котором $v = v_{\max}$:

$$[S_{\text{opt}}] = \sqrt{K_m K_S}$$

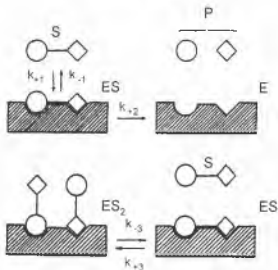


Рис. 14.6. Концептуальная модель субстратного торможения ферментативной реакции

Существуют и другие виды ингибирования. Так, было показано, что ферменты, стоящие в начале цепи ферментативных реакций, могут регулироваться (ингибироваться или активироваться) конечными метаболитами цепи (метаболитами-эфферами). Регулируемые таким образом ферменты называют аллостерическими ферментами. Они обладают четвертичной структурой и имеют аллостерический центр – участок молекулы, пространственно отделенный от активного центра. Молекула метаболита-эффера соединяется с аллостерическим центром и изменяет структуру аллостерического фермента, что сказывается на скорости катализируемой им реакции,

а с ней на работе всей цепи ферментов. Для аллостерической регуляции были предложены аллостерические модели и выведены соответствующие математические уравнения.

Кинетический метод, основанный на построении модели протекания ферментативного процесса, выводе для нее математического уравнения и экспериментальной проверке вытекающих из него результатов, позволил сделать определенные заключения относительно молекулярного механизма ферментативного катализа. Он показал, что обязательной стадией ферментативной реакции является образование одного или нескольких промежуточных соединений фермента с субстратами (фермент-субстратных комплексов), ингибиторами и активаторами. Связывание молекулы фермента с этими веществами вызывает существенное изменение ее структуры. В двухсубстратных реакциях с упорядоченным механизмом, в частности, присоединение второго субстрата к ферменту становится возможным лишь после того, как с ним свяжется первый субстрат и путем соответствующего изменения конформации фермента подготовит контактную зону к связыванию второго субстрата. Молекула фермента имеет специализированные участки (активный центр с каталитической зоной и зонами связывания, аллостерический центр), выполняющие конкретные функции. Все это свидетельствует о том, что в основе работы фермента лежат строго упорядоченные изменения его пространственной структуры. В этом отношении он подобен управляемой «макромолекулярной машине», которая, не расходуясь в процессе реакции, лишь путем изменения своей конформации способна превращать субстрат в продукт со скоростью до миллионов молекул в минуту.

Однако кинетический метод не дает возможности ответить на основной вопрос – почему фермент во много раз ускоряет химическую реакцию? Достаточно правдоподобный ответ на него дает термодинамический подход.

14.4. Термодинамические аспекты катализа

Термодинамика изучает законы взаимных превращений различных видов энергии, связанных с переходом ее между телами в виде теплоты и работы. Химическая термодинамика применяет эти законы к химическим системам. Под системой в термодинамическом смысле понимают выделенную из внешней среды реальными или мысленными границами совокупность тел, способных обмениваться между собой энергией и веществом. Необходимым свойством такой систе-

мы является наличие большого числа составляющих ее частиц, достаточного для того, чтобы законы статистики в отношении системы выполнялись достаточно точно.

Внутренняя энергия (U) системы складывается из кинетической энергии ее молекул, их структурных единиц (атомов, электронов, ядер, протонов, нейтронов), потенциальной энергии взаимодействия между собой всех названных частиц, а также собственной энергии, отвечающей массе покоя частиц (mc^2). Сюда не входит энергия движения системы как целого тела и ее потенциальная энергия во внешних полях (гравитационном, магнитном и др.). Само значение внутренней энергии знать невозможно, поскольку невозможно учесть значения всех ее составляющих. Но для термодинамики это и не требуется, поскольку она оперирует не со свободной энергией, а с ее изменением ΔU . Последнее может происходить путем обмена системы с другими системами теплотой и совершения работы ею или над ней.

При протекании химических реакций принимает участие наиболее лабильная часть внутренней энергии, преимущественно связанная с взаимодействием валентных электронов. Ее называют свободной энергией G . Переход молекул в процессе химической реакции из одного устойчивого состояния в другое связан с преодолением энергетического барьера, прежде всего, отталкивания электронных оболочек сближаемых частиц, количественно оцениваемого через энергию активации E_a . Последняя расходуется на образование неустойчивого промежуточного соединения (состояния), называемого активированным комплексом. В результате протекания реакции свободная энергия системы может уменьшиться (экзергоническая реакция), увеличиться (эндергоническая реакция) или остаться практически неизменной. Поскольку энергетический барьер разделяет два устойчивых состояния системы, нет принципиального препятствия для протекания химических реакций в обоих направлениях – как в прямом, так и в обратном. Реакция идет преимущественно в одном направлении (является односторонней) в тех случаях, когда образующийся продукт практически выводится из реакции (выделяется в виде газа, выпадает в труднорастворимый осадок, слабо диссоциирует, используется сразу же в другой реакции и т. д.) или если значения энергий активации прямой и обратной реакций численно сильно различаются между собой: реакция будет идти с большей скоростью в том направлении, для которого энергия активации ниже. Это следует из уравнения Аррениуса для константы скорости реакции

$$k = k_0 e^{-E_a / RT},$$

где k_0 – константа (предэкспоненциальный множитель); R – универсальная газовая постоянная; T – температура (°K).

Так, в реакции



образуется активированный комплекс ABC^* (рис. 14.7).

При прямой реакции ($AB+C \rightarrow B+AC$) происходит снижение свободной энергии ($\Delta G = G_2 - G_1 < 0$), а при обратной реакции ($B+AC \rightarrow AB+C$), напротив, свободная энергия возрастает ($\Delta G = G_1 - G_2 > 0$).

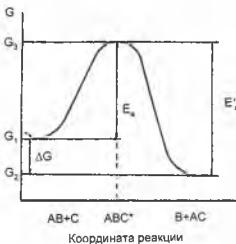


Рис. 14.7. Схема изменения свободной энергии системы в реакции $AB+C \rightleftharpoons B+AC$

Соответственно, энергия активации прямой реакции ниже, чем обратной ($E_a < E'_a$). Физическую сущность зависимости константы скорости реакции от энергии активации и температуры, выраженной уравнением Аррениуса, раскрывает распределение молекул по энергии при различных температурах (распределение Максвелла-Больцмана). Для идеального газа графики распределения Максвелла-Больцмана (рис.14.8) имеют некоторое сходство с кривыми нор-

мального распределения. С увеличением температуры от T_1 до T_2 число молекул, превысивших энергию активации (E_a), растет (площади заштрихованных фигур над графиком).

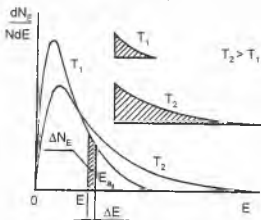


Рис.14.8. Распределение молекул (dN_E / NdE) по энергии (E) при различных температурах (T). Число молекул N_E , имеющих энергию в интервале от E до $E + \Delta E$, на графике выражается площадью заштрихованного столбца, общее число молекул N — всей площадью под кривой распределения

Число молекул, превысивших энергию активации при неизменной температуре, будет расти также в случае уменьшения значения энергии активации. На графике распределения это выразится в виде увеличения площади фигуры, располагающейся справа от E_a ($E \geq E_a$). Таким образом, с увеличением температуры и (или) с уменьшением энергии активации доля молекул, способных преодолеть энергетический барьер (образовать активационный комплекс), растет. Для примера, представленного на рис. 14.7, в экзергонической ($\Delta G < 0$) реакции будет принимать участие большая доля молекул (от общего числа молекул АВ и С), чем в эндергонической ($\Delta G > 0$) реакции, так как $E_a < E'_a$ (на величину ΔG).

Следует отметить, что характер распределения молекул по энергии в жидкостях имеет принципиальное сходство с таковым для идеальных газов. Поэтому уравнение Аррениуса оказывается справедливым и для реакций, протекающих в жидких средах.

Все сказанное выше позволяет сделать предположение, что основной вклад в ускорение реакций, катализируемых ферментами, вносит не увеличение температуры (они способны к денатурации), а уменьшение энергии активации.

Существенным обстоятельством, многократно повышающим каталитическую активность ферментов по сравнению с катализаторами небиологической природы, является разделение реакций на ряд стадий с малыми энергиями активации, то есть замена одного высокого энергетического барьера на несколько более низких. Так, рассмотренная реакция $AB+C \rightarrow V+AC$, в которой происходит замещение фрагмента В молекулы АВ молекулой С, в организме протекает с участием фермента класса трансфераз и рассматривается как перенос группы А молекулы АВ на молекулу С. Реакция осуществляется по механизму «пинг-понга» в несколько стадий. Вначале происходит образование первичного ФСК путем присоединения молекулы АВ к ферменту ($AB+E \rightarrow EAB$). Затем от этой молекулы отщепляется фрагмент В ($EAB \rightarrow EA+V$), после чего к комплексу EA присоединяется молекула С ($EA+C \rightarrow EAC$) и в результате протекания каталитической реакции образуется конечный продукт – молекула АС ($EAC \rightarrow AC+E$). Таким образом, реакция, катализируемая трансферазой, включает, как минимум, четыре стадии со своими энергиями активации (рис.14.9).

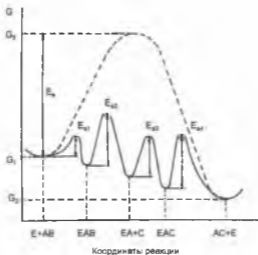


Рис.14.9. Схема изменения свободной энергии системы в реакции $AB+C \rightarrow V+AC$, протекающей неферментативным путем (штриховая линия) и с участием фермента

14.5. Физико-химические механизмы ферментативного катализа

В основе работы тысяч разных ферментов, сгруппированных по функциональному признаку в 6 классов, лежат всего два элементарных процесса – разрыв химической связи и ее образование. Казалось бы, молекулярный механизм ферментативного катализа должен иметь универсальный характер, не представляющий сложности для разгадки. Однако до настоящего времени еще не создана общая теория биологического катализа, на основе которой можно было бы объяснить ферментативное действие. Более того, можно утверждать, что еще нет такого фермента, механизм действия которого был бы твердо установлен, а многочисленные схемы, которые приводятся в литературе и поясняют, каким образом химические группы активных центров ферментов взаимодействуют с молекулами субстратов, вызывая наблюдаемые реакции, рассматриваются лишь как гипотетические или согласующиеся с имеющимися данными.

Тем не менее были сформулированы общие подходы, которыми нужно руководствоваться при изучении механизма биологического катализа. Прежде всего, ферменты снижают энергию активации и тем самым повышают скорость реакции. Это достигается благодаря наличию в молекуле фермента активного центра, который состоит из небольшого числа реактивных атомов или групп.

Роль реактивных групп выполняют аминокислотные остатки полипептидной цепи молекулы фермента или простетические группы, входящие в его состав. Ферментативная реакция протекает на активном центре фермента.

Академик А.Е. Браунштейн отмечает пять качественных факторов, ответственных за каталитическое действие ферментов:

1. Эффект сближения, обусловленный большим сродством фермента и субстрата. Он равносителен увеличению концентрации реагирующих веществ.

2. Эффект ориентации, который проявляется в строгом взаимном расположении реагентов, кофакторов и активного центра.

3. Эффект синхронного кислотно-основного катализа, проявляющийся посредством воздействия на субстрат нуклеофильных и электрофильных групп активного центра.

4. Эффект поляризации, который вызывает активацию молекулы субстрата под действием активных групп фермента.

5. Эффект индуцированного контакта, вызывающий изменение конформации белка (фермента) и субстрата в ФСК, при котором

функциональные группы фермента занимают положение, оптимальное для протекания каталитического процесса.

К названным факторам следует добавить:

- многоступенчатый (многостадийный) характер протекания ферментативных реакций, благодаря чему энергия активации каждой отдельной стадии относительно невелика;

- независимость времени контакта участников реакции между собой и с ферментом от частоты их столкновений благодаря образованию ФСК (время контакта увеличивается на несколько порядков по сравнению с неферментативной реакцией);

- особенности микросреды активного центра, которая характеризуется сильно развитой микрогетерогенностью. В целом микросреда поверхностного слоя белков обладает, как правило, значительно более низкой диэлектрической проницаемостью (в зоне связывания активного центра она на порядок ниже, чем для воды), благодаря чему усиливается электростатическое взаимодействие между зарядами субстрата и поверхностного слоя фермента;

- большую, чем в окружающем растворе, гидрофобность среды активного центра, вследствие чего происходит десольватация заряженного субстрата, приводящая к дестабилизации разрываемой связи;

- повышенную вязкость поверхностного слоя белковых глобул, что резко снижает подвижность связанных с ферментом молекул;

- структурные особенности поверхностного слоя белковых глобул, позволившие сосредоточить в активном центре большое число различных по химической природе функциональных групп, способных не только сорбировать субстрат на ферменте, но и взаимодействовать с ним также и химически, направляя реакцию по пути с более низкими энергиями активации.

Существуют и некоторые другие факторы, благоприятствующие ферментативному катализу.

Особое место в проблеме ферментативного катализа занимает вопрос о молекулярном механизме осуществления названных ранее элементарных процессов – разрыва химической связи и ее образования.

Хорошо объясняет механизм действия многих ферментов, прежде всего гидролаз, лиаз, трансфераз, теория (модель) «дыбы». Применительно к гидролизу молекулы АВ, содержащей две части А и В, соединенные связью, которую нужно разрушить, модель «дыбы» предусматривает присоединение к двум участкам фермента (контактным площадкам) частей А и В. При этом происходит растяжение связи между А и В, перемещение электронов и в конечном счете ее разрыв, сопровождающийся присоединением водорода воды к одной

части молекулы и гидроксила воды к другой ее части. В случае обратной реакции происходит сближение продуктов гидролиза на поверхности фермента. Вновь наблюдается перераспределение электронов и синтезируется вещество АВ. Эта модель – статическая. В действительности рассматриваемая система упругая, в которой возможен резонанс колебаний молекул субстрата и фермента. Для разрыва связи в такой динамической системе потребуется значительно меньшее количество энергии.

Известно, что белковые молекулы обладают набором конформационных степеней свободы (Блюменфельд Л.А., 1954) и могут существовать в нескольких конформационных состояниях, между которыми со временем устанавливается равновесие. Не исключено, что среди них существуют конформации с повышенным значением свободной энергии и более благоприятным для связывания с субстратом расположением контактных участков. Образование ФСК, воздействуя на конформацию фермента, ведет к возврату ее в прежнее состояние, при этом избыток энергии расходуется на разрыв химической связи в молекуле субстрата. Молекула фермента в метастабильном состоянии напоминает сжатую пружину, которая после образования ФСК получает возможность распрямиться и разорвать химическую связь. Тепловая энергия, «заимствованная» молекулой фермента на структурную перестройку, расходуется затем на преодоление энергетического барьера, а после разрыва химической связи возвращается в виде тепла окружающей среде, при этом энтропия химической системы повышается.

На возможность участия «структурной» энергии макромолекул в ферментативном катализе указывал в 1935 г. Э.С. Бауэр [10]. Он полагал, что молекулу фермента в неравновесное, деформированное состояние переводит энергия, выделяющаяся в катализируемом им процессе.

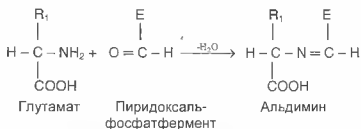
В качестве примера, демонстрирующего многостадийный характер протекающего на активном центре ферментативного процесса, приведем одну из реакций переаминирования, которые открыл А.Е. Браунштейн. Рассматриваемая реакция катализируется аспаратаминотрансферазой (E), содержащей в качестве небелковой части пиридоксальфосфат. Она осуществляется по механизму «пинг-понга» и является двухсторонней. Для удобства изложения рассмотрим лишь прямую реакцию:



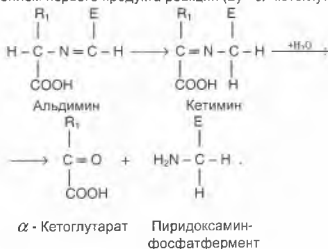
В химических превращениях обоих субстратов на активном центре непосредственное участие принимает формильная группа пиридоксальфосфата



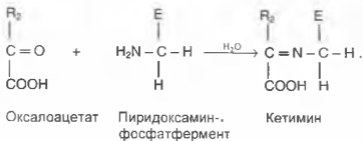
Первым субстратом (АВ), который присоединяется к ферменту, является глутамат:



Образующийся фермент-субстратный комплекс (ЕАВ) альдимин превращается в кетимин, который подвергается гидролизу с высвобождением первого продукта реакции (В) – α -кетоглутарата:



К пиридоксаминфосфатферменту, содержащему аминогруппу А субстрата АВ, присоединяется второй субстрат (С) – оксалоацетат:



Образующийся кетимин превращается в альдимин, который гидролизуется с высвобождением второго продукта (АС) – аспартата – и пиридоксальфосфатфермента:

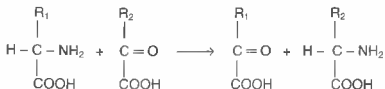


Обратная реакция:



проходит через все те же промежуточные состояния, но в противоположном направлении.

Формильная группа пиридоксальфосфата, «иммобилизованного» на аспаратаминотрансферазе, участвуя в химической реакции перереаминарования, способствует образованию ряда активированных комплексов с невысокими значениями энергии активации. В целом же фермент организует прохождение реакции



по многоэтапной траектории. Помимо четырех энергетических барьеров, изображенных на рис. 14.9, участники реакции дополнительно преодолевают еще как минимум два, связанных с превращением альдимины в кетимин (перед высвобождением первого продукта) и кетимина в альдимин (перед высвобождением второго продукта).

Сходным образом обстоит дело и с тысячами других ферментативных реакций.

ГЛАВА ПЯТНАДЦАТАЯ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МАТРИЧНЫХ СИНТЕЗОВ

15.1. Репликация ДНК

15.1.1. Полуконсервативная репликация ДНК

Многочисленными исследованиями было установлено, что в S-период (синтетический период) митотического цикла клетки в ядре всех эукариотических клеток происходит удвоение практически всей ДНК (кроме центромерных участков, которые удваиваются в начале анафазы митоза) [1]. Таким образом, обе дочерние клетки должны получить идентичную исходной (материнской) дочернюю молекулу ДНК. Не ясным оставался, однако, вопрос о том, копируется ли исходная двухцепочечная молекула ДНК таким способом, что сразу образуется новая целая двухцепочечная молекула ДНК или же две цепи исходной молекулы разделяются в процессе репликации.

Мэтью Мезельсон и Франклин Сталь в конце пятидесятых годов на примере синтеза ДНК у *E. Coli* установили, что репликация протекает *полуконсервативным* способом. В результате использования тяжелого изотопа азота N^{15} они установили, что каждая цепь родительской двухцепочечной ДНК является матрицей для синтеза новой комплементарной цепи и что две цепи (исходная и вновь синтезированная), соединяясь, образуют следующее поколение молекул ДНК.

Этот механизм и получил название *полуконсервативной репликации*. Полученные результаты полностью исключали *консервативный способ репликации* (который выдвигался другими учеными, как основной путь репликации ДНК), при котором одна дочерняя ДНК должна была бы содержать обе исходные цепи, а другая состояла бы из двух новосинтезированных (дочерних) цепей. Опыт М. Мезельсона и Ф. Сталя позволил также отвергнуть так называемый *дисперсивный механизм репликации*, при котором каждая дочерняя цепь ДНК состоит из коротких участков как родительской, так и новообразованной ДНК, соединенных между собой случайным образом.

15.1.2. Репликация ДНК у прокариот и вирусов

ДНК бактерий и многих ДНК-содержащих вирусов представляет собой кольцевую двойную спираль. Эксперименты Джона Кэрнса показали, что ДНК в клетках *E. coli*, как правило, реплицируется, оставаясь в кольцевой форме. Репликация происходит в двух направлениях, то есть существуют *2 репликативные вилки* (место расплетания молекулы ДНК и начала ее удвоения). Обе вилки возникают в одной точке и удаляются от нее в обоих направлениях одновременно, пока снова не встретятся. В этой точке два полностью синтезированных дочерних двухцепочечных кольца разделяются: каждое из них содержит одну старую (материнскую) и одну новую (дочернюю) цепь.

Репликация геномов вирусов часто осуществляется с использованием ферментов клетки-хозяина и может быть организована иначе, чем у бактерий. Так, ДНК некоторых вирусов реплицируются в одном направлении по механизму "катящегося кольца" (рис. 15.1).

Весь показанный на рисунке процесс можно разделить на несколько этапов. Сначала в одной из цепей происходит разрыв и к 3'-концу этой цепи начинают присоединяться нуклеотиды. В результате этого процесса разорванная родительская цепь удлиняется комплементарно другой родительской цепи, вытесняя свой собственный 5'-конец. Затем по мере того, как вытесненная цепь сматывается с кольца, начинается ее репликация. После завершения синтеза новой дочерней цепи, комплементарной этой разматывающейся цепи, новообразованный линейный дуплекс отщепляется с помощью нуклеазы и появляется линейная вирусная ДНК. Другая (дочерняя) новообразованная цепь теперь повторяет процесс репликации, а именно, ее 3'-конец удлиняется, а 5'-конец сматывается в кольцо и служит матрицей для синтеза новой дочерней цепи. Таким образом, по

матрице в виде «катящегося кольца» может быть синтезировано много новых линейных дуплексов.

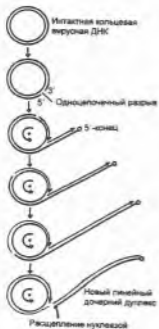


Рис. 15.1. Репликация ДНК некоторых вирусов по механизму «катящегося кольца» [2]

Артур Корнберг и его коллеги установили, что ферменты (15-20 различных белков), участвующие в синтезе ДНК, представляют собой комплекс, названный *реплисомой*. Реплисома имеет диаметр 8-12 нм и связана с мембраной посредством гидрофобных взаимодействий.

Исходя из скорости движения репликативной вилки *E. coli*, можно заключить, что при $+37^{\circ}\text{C}$ новая ДНК синтезируется со скоростью свыше 45 000 нуклеотидных остатков в минуту (в расчете на одну вилку). Поскольку на каждый полный виток двойной спирали приходится ≈ 10 пар оснований, то скорость расплетания родительской ДНК в репликативной вилке у клеток *E. coli* составляет более 4500 об/мин, что превышает скорость вращения вала в двигателе автомобиля, двигающегося со скоростью 110 км/ч [2].

В клетках эукариот также встречается механизм «катящегося кольца», который, например, используется в ооцитах в процессе синтеза генов рРНК. С помощью этого механизма протекает *амплификация*, то есть избирательная многократная репликация генов, кодирующих рРНК. Этот механизм необходим ооцитам для того, чтобы

производить много рибосом, необходимых для быстрого синтеза клеточных белков в процессе ускоренного роста эмбриона на ранних стадиях развития.

15.1.3. Репликация ДНК у эукариот

В ядрах эукариотических клеток ДНК находится в комплексе с гистоновыми белками (примерно каждые 200 пар оснований ДНК образуют суперспираль, накрученную на октамер, образованный четырьмя видами гистонов: H2A, H2B, H3 и H4). Такой комплекс называется нуклеосомой. При синтезе дочерних цепей ДНК нуклеосомы на некоторое время разрушаются, но сразу за репликативной вилкой они вновь собираются.

В целом процесс репликации можно разделить на три основных этапа: 1) инициация (начало синтеза дочерних полидезоксирибонуклеотидных цепей); 2) элонгация (репликация участков материнских цепей ДНК и соединение друг с другом дочерних и материнских цепей); 3) терминация (завершение биосинтеза новых молекул ДНК).

Для того, чтобы нативная молекула ДНК могла начать реплицироваться полуконсервативным способом, она должна сначала отделиться от гистоновых белков, а затем разделиться на составляющие ее цепи.

Процессу инициации предшествует раскручивание спирали ДНК. Цепи ДНК раскручиваются не по всей длине, а только на коротком участке, где и образуется вилка репликации. Перемещение репликативной вилки возможно только при раскручивании двухспиральной ДНК (*хеликса*). Этот процесс возможен благодаря участию нескольких ферментов, например *хеликазы* и *ДНК-гиразы* (рис. 15.2).

Хеликазы расплетают короткие участки ДНК, расположенные непосредственно перед репликативной вилкой. Для раскручивания ДНК требуется энергия. На разделение каждой пары оснований расходуется энергия гидролиза двух молекул АТФ до АДФ и фосфата. После того, как небольшой участок ДНК оказывается расплетенным, к каждой из разделившихся цепей прочно присоединяются несколько молекул *ДНК-связывающего белка (ДСБ)*, которые препятствуют обратному воссоединению цепей, то есть образованию комплементарных пар оснований нуклеотидов. В результате этого процесса нуклеотидные последовательности цепей ДНК оказываются доступными для репликативной системы, то есть ДНК подготовлена для начала биосинтеза.



Рис. 15.2. Схематическое изображение основных этапов репликации ДНК [2]

Некоторые авторы считают, что инициация процесса репликации начинается уже тогда, когда возникает репликативный комплекс ферментов и белковых факторов и завершается формированием репликативной вилки [3]. По их мнению, инициация биосинтеза ДНК начинается с образования на одной из материнских цепей ДНК так называемого затравочного олигонуклеотида (несколько десятков звеньев) со свободной гидроксильной группой на 3'-конце этого фрагмента. Этот короткий олигонуклеотид является *праймером*, то есть предшественником будущей цепи ДНК и синтезируется при участии фермента *праймазы* (*примазы*). Только после его создания в процесс репликации включается *ДНК-полимераза III* (которая синтезирует дочернюю цепь ДНК по матрице материнской цепи). Позже праймер вырезается при помощи нуклеаз, а недостающий фрагмент дочерней цепи достраивается дезоксирибонуклеотидами.

Элонгация полинуклеотидных дочерних цепей ДНК осуществляется с помощью ДНК-полимеразных реакций, идущих у животных со скоростью 100 нуклеотидов в секунду. ДНК-полимераза может присоединять нуклеотиды только к 3'-концу и не может присоединять их к 5'-концу. Таким образом получается, что ДНК-полимераза способна удлинять только одну из двух растущих цепей в направлении движения репликативной вилки. Но исследованиями было показано, что в репликативной вилке с большой скоростью осуществляется синтез двух противоположно ориентированных цепей ДНК. Направление одной цепи 5'→3', как было отмечено ранее, совпадает с направлением движения вилки. Эту цепь называли *лидирующей (ведущей)*. Вторая цепь синтезируется немного медленнее и ее называли *запаздывающей (отстающей)*. Но механизм этого процесса оставался неясным.

В 1968 г. Рейджи Оказаки и его коллеги показали, что синтез ДНК происходит на обеих цепях материнской ДНК в направлении 5'→3' и идет прерывисто, отдельными фрагментами. В дальнейшем эти фрагменты получили название *фрагментов Оказаки*. Но в лидирующей цепи ДНК образуются более крупные фрагменты (1000-2000 нуклеотидных остатков). Постепенно фрагменты Оказаки укрупняются и, наконец, образуют непрерывные дочерние цепи ДНК.

Синтез другой (отстающей) цепи идет в направлении 5'→3', но противоположном движению репликативной вилки. В этой цепи ДНК образуются более короткие фрагменты (от 40 до 290 нуклеотидов). Р. Оказаки показал, что для образования коротких фрагментов ДНК отстающей цепи необходимо присутствие рибонуклеозид-5'-трифосфатов, то есть для синтеза ДНК необходим синтез РНК. Дальнейшими исследованиями было показано, что для синтеза фрагментов Оказаки в качестве затравок (*праймеров*) требуются короткие отрезки РНК, комплементарные матричной цепи ДНК. Эти отрезки РНК также синтезируются в направлении 5'→3', но для их образования требуются особые ферменты – *праймазы (примазы)* – специальные РНК-полимеразы [4, 5].

РНК-затравка обычно состоит из небольшого количества (около 9) рибонуклеотидных остатков, к которым затем ДНК-полимераза III присоединяет дезоксирибонуклеотидные остатки, образуя фрагмент Оказаки. После окончания синтеза фрагмента Оказаки РНК-затравка удаляется не вся сразу, а нуклеотид за нуклеотидом с помощью 5'→3'-эксонуклеазной активности ДНК-полимеразы I. Каждый из отщепленных рибонуклеотидных мономеров замещается на соответствующий дезоксирибонуклеотид в ходе полимеразной реакции, ка-

тализируемой ДНК-полимеразой I. Укрупнение фрагментов Оказаки путем их сшивания происходит с участием *ДНК-лигазы*. Сшивание фрагментов Оказаки требует затраты энергии, которая поставляется в ходе сопряженного гидролиза пиррофосфатной связи НАД⁺ (в бактериальных клетках) или АТФ (в животных клетках).

Хромосома эукариот имеет достаточно большие размеры и для нее характерна *полирепликонная* структура, то есть в ней есть множество независимых репликонов, каждый из которых содержит начало и терминатор. Соседние репликоны ориентированы противоположно, после завершения репликации их синтезированные комплементарные нити сшиваются. Размеры репликонов составляют от 10 до 100 мкм, что отвечает $3 \cdot 10^4$ - $3 \cdot 10^5$ нуклеотидных пар. Высокая скорость репликации обеспечивается образованием большого числа репликативных вилок.

Предполагается, что терминация биосинтеза ДНК заканчивается, когда встречаются две репликативные вилки при удвоении как кольцевых, так и линейных ДНК.

Важно отметить, что процесс репликации у всех видов организмов протекает со значительно более высокой степенью точности, чем процессы транскрипции и трансляции. Частые ошибки в репликации подвергли бы большому риску сохранность видов и их жизнеспособность. Ошибки же в транскрипции и трансляции гораздо менее опасны, поскольку они влияют на образование РНК или белка только в одной клетке и не изменяют всю последующую родословную вида.

15.1.4. Репарация повреждений ДНК

Различные по природе (химические и физические) и интенсивности факторы внешней среды могут вызвать повреждение ДНК. Так, например, ультрафиолетовое облучение в больших дозах оказывает летальное, а в малых – антимиотическое и мутагенное действие. При этом в молекуле ДНК возникает ряд изменений, например, происходит дезаминирование цитозина, он превращается в урацил, что может привести к возникновению мутации. Тиминовые основания могут образовывать димеры – двойные тиминные кольца, а иногда появляются участки локальной денатурации ДНК, которые препятствуют репликации ДНК. Повреждения ДНК можно разделить на два основных типа: 1) повреждения оснований (гидролитическое выщепление оснований, гидролитическое дезаминирование оснований, образование димеров тимина); 2) повреждение цепей (одноцепочечные разрывы, поперечные сшивки) [1, 6]. Могут также возникнуть и ошиб-

ки при репликации. Эти и многие другие факторы должны были бы привести к необратимым изменениям в структурно-функциональной организации ДНК. Однако это происходит не всегда.

В ходе экспериментов показано, что частота ошибок при репликации ДНК, например *E. coli*, не превышает 1 на 10^9 - 10^{10} нуклеотидов. Считалось, что столь высокая степень точности воспроизведения генетической информации целиком определяется точностью уотсон-криковского спаривания между матричной (материнской) и новообразованной (дочерней) цепями. Однако в результате ряда экспериментов выяснилось, что если бы точность репликации зависела исключительно от правильности спаривания оснований, то частота ошибок была бы значительно выше – приблизительно 1 на 10^4 - 10^5 нуклеотидных остатков. Следовательно, чтобы объяснить такую низкую частоту ошибок при репликации *in vivo*, необходимо предположить участие в процессе репликации еще какого-то одного или нескольких факторов и механизмов [2].

Клетки живых организмов в процессе эволюции приобрели способность репарировать повреждения ДНК. Один из таких процессов репарации протекает с участием света. Этот механизм называется *фоторепарацией (прямой репарацией)* и имеется у бактерий и растений. Существует фермент, соединенный с хромофором, который поглощает видимый свет и доставляет необходимую для осуществления реакции энергию. Фермент специфически связывается с тиминным димером, расщепляет его, а затем отделяется от ДНК. В результате этого процесса функции ДНК восстанавливаются примерно на 90%.

Другой процесс, протекающий у бактерий, получил название *темновая (эксцизионная) репарация ДНК*. Этот вид репарации связан с вырезанием (эксцизией) поврежденного участка. Специфическая эндонуклеаза распознает повреждение и надрезает нить ДНК вблизи тиминового димера. Другой фермент – *Уф-эндонуклеаза* – вырезает олигонуклеотид (12-15 нуклеотидов), содержащий тиминный димер. Затем ДНК-полимераза I заполняет образовавшийся разрыв путем включения других нуклеотидов. Фермент ДНК-лигаза с помощью фосфодизфирной связи соединяет вновь синтезированный фрагмент с остальной частью ДНК.

Этот механизм репарации является очень важным, так как посредством его может происходить исправление множества потенциально летальных нарушений генома. Так, у бактерий он может устранять разрывы полинуклеотидных цепей ДНК, вызванные действием рентгеновских лучей. При темновой репарации могут удаляться

сшивки пуриновых оснований в ДНК, вызванные действием иприта. Считают, что у животных подобную функцию может выполнять фермент *репарационная эндонуклеаза II*. На основании всего вышеизложенного можно с уверенностью сказать, что системы репарации повышают стабильность ДНК – носителя наследственной информации.

Системы репарации у эукариот играют большую роль в сохранении целостности генома. Усилия многих исследователей направлены на выяснение связи процесса старения человека со снижением способности к репарации ДНК и, соответственно, с увеличением частоты мутаций.

15.2. Синтез РНК (транскрипция ДНК)

Как отмечалось в предыдущем разделе, в процессе репликации ДНК генетическая информация воспроизводится целиком, чтобы по завершении митотического цикла передаться дочерним клеткам. Но, кроме этого, наследственная информация реализуется (*экспрессируется*) в клетке, обуславливая все ее структурно-функциональные свойства. Следует отметить, что экспрессируется в данный момент времени только небольшая часть нативной ДНК. Процесс реализации наследственной информации состоит из двух последовательных стадий: 1) *транскрипции*; 2) *трансляции*.

Транскрипцией называется процесс, посредством которого заключенная в ДНК генетическая информация «переписывается» в форме одиночной цепи РНК. В этом процессе с помощью ферментной системы (*ДНК-зависимой РНК-полимеразы*) происходит синтез цепи РНК, нуклеотидная последовательность которой комплементарна последовательности участка одной из цепей ДНК (*транскрибируемой цепи*). Образовавшиеся молекулы РНК называются *транскриптами*.

Поскольку синтез белка протекает главным образом на рибосомах в цитоплазме клеток, а ДНК находится в основном только в ядре, то было высказано предположение, что существует какой-то вид макромолекул, переносящий генетическую информацию для белкового синтеза. Логическим кандидатом на эту роль была РНК, поскольку ее обнаружили и в ядре, и в цитоплазме. Было также отмечено, что начало синтеза белка в клетке сопровождается увеличением содержания РНК в цитоплазме и увеличением скорости ее обновления. Эти исследования позволили Ф. Крику сформулировать «центральную догму молекулярной генетики», согласно которой РНК выполняет функцию переноса генетической информации от ДНК к рибосомам,

где происходит биосинтез белка:



В 1961 г. Ф. Жакоб и Ж. Моно предложили название *матричная РНК (мРНК)* для тех молекул клеточной РНК, которые переносят генетическую информацию от ДНК к рибосомам, то есть к месту, где эти молекулы-переносчики служат матрицами для биосинтеза полипептидных цепей. В каждый момент времени в клетке (особенно в растущей) присутствует большое количество мРНК, каждая из которых кодирует одну или несколько полипептидных цепей.

Время полужизни мРНК у эукариот варьирует от 20 мин до нескольких часов. Таким образом, для экспрессии гена необходимо постоянное воспроизведение молекул мРНК.

В результате транскрипции образуются три основных класса РНК: мРНК, тРНК и рРНК.

15.2.1. Транскрипция гена у прокариот

Около 90-95% хромосомы *E. coli* кодирует матричные РНК. Остальная часть хромосомы кодирует транспортные и рибосомные РНК, а также включает регуляторные последовательности, лидеры, спейсеры и хвостовые последовательности.

В целом все многообразие мРНК у прокариот можно разделить на две большие группы: *монокенные*, или *моноцистронные* (мРНК, несущие информацию только об одном полипептиде), и *полигенные*, или *полицистронные* (мРНК, кодирующие два или большее количество разных полипептидов).

Как и репликация, транскрипция состоит из трех основных этапов: 1) *инициация*; 2) *элонгация*; 3) *терминация*. Гены могут транскрибироваться как независимо (если есть собственные промотор и терминатор) или координированно (если группа генов представляет собой непрерывный участок ДНК и имеет общий промотор и общий терминатор).

Процесс транскрипции ДНК протекает избирательно, он должен направляться особыми регуляторными последовательностями, указывающими начало и конец участков ДНК, подлежащих транскрипции.

Гены, как единицы процесса транскрипции, несут информацию о структуре одного или нескольких белков. Участок ДНК, в котором за-

ключена информация о структуре одного белка, называется *цистроном* или *структурным геном*. Регуляция транскрипции осуществляется благодаря наличию в ДНК специальных регуляторных участков. Регуляторная зона включает в себя *промотор*, *оператор*, а нередко и другие участки управления (рис. 15.3).

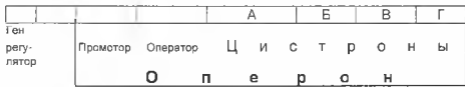


Рис. 15.3. Строение оперона прокариот

С *промоторным* участком ДНК прочно связывается ДНК-зависимая РНК-полимераза. *Оператором* является регуляторный участок, который связывается с *репрессорами* – белками, контролирующими синтез мРНК (в соответствии с потребностями клетки). В некоторых единицах транскрипции (*опероны*) между оператором и структурными генами располагается так называемая *лидерная зона*. Она транскрибируется, но, как правило, не транслируется. В ее границах располагаются участок связывания рибосомы на мРНК и *аттенюатор*, регулирующий транскрипцию и оказывающий влияние на связь РНК-полимеразы с матрицей ДНК. После структурных генов находится ген *терминатор*.

Опероном называется последовательность нуклеотидов ДНК, ограниченная промотором и терминатором, кодирующая одну молекулу мРНК и контролируемая оператором. У прокариот известны опероны, в состав которых входит несколько *цистронов* (*генов*), которые кодируют структуру ферментов одной метаболической цепи. Благодаря наличию регуляторной зоны все цистроны включаются и выключаются одновременно [4].

Первой стадией ДНК-зависимого синтеза РНК (транскрипции) является *инициация*, которая начинается со взаимодействия РНК-полимеразы с определенным участком ДНК – промотором.

ДНК-зависимая РНК-полимераза *E.coli* представляет собой большой белковый комплекс (молекулярная масса 500 000), содержащий четыре разные субъединицы: α , β , β' и σ , формирующие холофермент ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$).

В узнавании РНК-полимеразой промоторного участка ДНК принимает участие специальный белок, называемый σ -фактором. В области промотора образуется сначала *закрытый стабильный комплекс* ДНК и РНК-полимеразы. Затем происходит локальная денатурация ДНК (разделение цепей ДНК на протяжении примерно 1,5 витка, называемое «глазок»), РНК-полимераза получает прямой доступ к основаниям ДНК и образуется *открытый комплекс*.

Если имеются соответствующие рибонуклеозидтрифосфаты (АТФ, ГТФ, УТФ, ЦТФ), то начинается синтез РНК. Первыми нуклеотидами при *инициации* транскрипции почти всегда бывают А или Г. Образуется трехкомпонентный комплекс *ДНК-РНК-полимераза-растущая цепь РНК*. Промотор не транскрибируется. Затем образуется первая 5',3'-фосфатная связь со вторым нуклеотидом.

Затем σ -фактор отделяется от холофермента и образуется так называемый *кор-фермент*, который начинает перемещаться по цепи ДНК, удлиняя молекулу РНК.

Элонгация (рост цепи) РНК происходит в направлении 5'→3'. Рибонуклеотиды присоединяются к 3'-ОН-концу последовательно, один за другим, комплементарно матрице ДНК. Это происходит по мере продвижения РНК-полимеразы по ДНК. Соответственно перемещается и участок локального расплетания ДНК. На транскрибированной части ДНК двухцепочечная спиральная структура восстанавливается сразу после ухода РНК-полимеразы.

Скорость процесса элонгации в клетках *E.coli in vivo* составляет 45-50 нуклеотидов в 1 с (при +37°C). В ходе элонгации новосинтезируемая цепь РНК временно образует (за счет спаривания ее оснований с основаниями матричной цепи ДНК) короткие отрезки гибридной спирали ДНК-РНК (10 нуклеотидных пар), которые необходимы для правильного считывания цепи ДНК. Гибридный дуплекс существует лишь непродолжительное время.

В *E. coli* присутствует только одна ДНК-зависимая РНК-полимераза, которая способна синтезировать не только мРНК, но также тРНК и рРНК.

В процессе транскрипции могут возникнуть ошибки спаривания, в результате которых в синтезированную РНК включаются «неправильные» нуклеотиды. Одна ошибка приходится на $2 \cdot 10^4$ включенных нуклеотидов [1].

Терминацию синтеза РНК вызывает последовательность нуклеотидов в ДНК, называемая *терминирующей последовательностью* (терминатором или стоп-сигналом). Это, как правило, ГЦ-богатые участки, на которых локальная денатурация ДНК затруднена. Это, в

свою очередь, замедляет перемещение РНК-полимеразы и служит сигналом к прекращению транскрипции.

Для прекращения транскрипции и отделения РНК-полимеразы от ДНК необходим еще один специфический белок, обозначаемый как *ρ-фактор*. Этот белок перемещается по ДНК вслед за РНК-полимеразой, догоняет ее на ГЦ-участке и облегчает расхождение цепей РНК и ДНК, так как обладает расплетающей (хеликазной) активностью. Этот белок имеет молекулярную массу 50 000 и является специфичным в отношении ДНК-РНК дуплекса, образующегося в ходе транскрипции. Поэтому, догнав полимеразу, *ρ-фактор* осуществляет отделение РНК-транскрипта и завершает тем самым транскрипцию.

В клетках бактерий к готовому, начинающему отделяться от матрицы участку мРНК присоединяются рибосомы. Они способствуют отделению мРНК от матрицы ДНК и начинают синтез белка. Так образуется единый *транскрипционно-трансляционный комплекс*, который удалось обнаружить методом электронной микроскопии.

15.2.2. Особенности транскрипции генов у эукариот

В каждой эукариотической клетке транскрибируется только незначительная часть ДНК. В клетках различных тканей транскрипция затрагивает как общие для всех видов клеток данного организма гены, так и специфичные для данной ткани. При клеточной дифференцировке, происходящей в процессе эмбрионального развития, транскрипция различных генов претерпевает последовательные изменения как качественного, так и количественного характера. Все эти и множество других процессов требуют слаженной системы регуляции транскрипции у эукариот, которая значительно сложнее таковой у прокариот.

Сложность регуляции транскрипции в эукариотических клетках проявляется в том, что в них используются различные виды РНК-полимераз, три из которых локализованы в ядре (РНК-полимеразы I, II, III), а одна – в митохондриях. В клетках растений есть еще одна РНК-полимераза, обнаруживаемая в хлоропластах. Для каждой из полимераз характерны специфические катализируемые реакции и существуют свои способы контроля.

Если у прокариот транскрипция и трансляция сопряжены, то у эукариот эти процессы разобщены во времени и пространстве. Определяющая роль в этом принадлежит ядру клетки, разграничивающему аппараты и процессы транскрипции и трансляции. Однако общие

принципы транскрипции про- и эукариот сходны. Но, безусловно, есть и принципиальные отличия.

При описании транскрипции у эукариот термин «оперон» может быть использован весьма условно, так как гены, детерминирующие структуру белков одной метаболической цепи, не обязательно расположены рядом, а могут быть локализованы даже в разных хромосомах. Для структурных генов эукариот выявлены не одиночные регуляторные участки, а их большие серии. Также отличаются ферментные системы, считывающие информацию с генома про- и эукариот, и этапы превращений первичных продуктов транскрипции в зрелые молекулы мРНК.

В результате транскрипции у эукариот (в отличие от прокариот) образуются сначала только предшественники тех или иных РНК (мРНК, рРНК, тРНК). Они гораздо длиннее, чем нативные, биологически активные молекулы РНК. Поэтому они подвергаются *процессингу* (*созреванию*).

Транскрипция у эукариотических организмов осуществляется примерно по тем же стадиям, что и у прокариот, но ее проводят три разные РНК-полимеразы, о чем упоминалось ранее. Транскрипция РНК-полимеразами I и III мало изучена. Однако было установлено, что РНК-полимераза I находится в ядрышке и участвует главным образом в биосинтезе рРНК. РНК-полимераза III отвечает за синтез тРНК и 5 S-рРНК. РНК-полимераза II эукариотических клеток катализирует синтез всех пре-мРНК. Механизм функционирования РНК-полимеразы II в значительной степени напоминает прокариотические системы.

Детально изученные гистоновые гены и позволяют сделать предположение о механизме работы эукариотических генов. Так, у большинства генов этой группы обнаружена сходная последовательность (ТАТААА или более короткая – ТАТА). Она расположена выше от точки начала транскрипции на 21-28 нуклеотидных пар. С обеих сторон от АТ-богатой последовательности располагаются ГЦ-богатые участки. Предполагают, что ТАТА-участок важен для инициации транскрипции, то есть он выполняет роль *промотора*. ТАТА-блок определяет выбор точки начала транскрипции, но не влияет на ее эффективность, поэтому иногда его называют *селектором*. На определенном расстоянии от ТАТА-последовательности располагается *инициаторная область*. С этой последовательности непосредственно начинается транскрипция мРНК, и она заканчивается до кодона АТГ [4]. На расстоянии примерно 100-300 пар нуклеотидов от точки начала транскрипции за селектором располагается другой функцио-

нально важный участок – *модулятор*. Модулятор определяет скорость синтеза неизменных по структуре молекул мРНК только в присутствии селектора и инициатора (рис. 15.4).

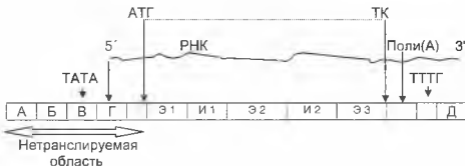


Рис. 15.4. Структура единицы транскрипции эукариот:

А и Б – модуляторы; В – селектор; Г – инициатор; Д – терминатор транскрипции; И – интроны; Э – экзоны; поли (А) – участок, являющийся затравкой при полиаденилировании в процессинге; 5' – первый транскрибируемый кодон; АТГ – кодон, иницирующий транскрипцию на рибосоме; ТК – кодон, терминирующий транскрипцию; экзоны – структурные гены (гены, кодирующие информацию о строении белка); интроны – неструктурные гены

Зоны структурных генов эукариот также отличаются от структурных генов бактерий. Так, между участками, кодирующими структуру белка (*экзонами*), существуют неструктурные области – *интроны* (в гене человека может быть от 2 до 50 интронов, длина которых варьирует от 50 до 20 000 пар оснований). Длина экзонов обычно не превышает 1 000 пар оснований. Число экзонов может варьировать в зависимости от природы генов.

Терминация транскрипции в эукариотических клетках изучена недостаточно. Существуют, например, сведения, что в области, примыкающей к 3'-концу структурной зоны некоторых генов (на расстоянии 23-47 пар нуклеотидов от ее последнего кодона), обнаружен консервативный участок, состоящий из двух коротких палиндромов, которые разделены последовательностью TTTT. Предполагают, что РНК образует в этом участке «шпильку», участвующую в терминации.

15.2.3. Процессинг мРНК

Поскольку в эукариотических клетках РНК-полимераза транскрибирует и экзоны, и интроны, причем точно в той последовательности, в которой они находятся в гене, то необходим процесс, способствующий удалению ненужных участков (интронных) мРНК. В эукариотических клетках первичные транскрипты превращаются в мРНК в ходе *процессинга*.

Пре-мРНК, составляющую основную фракцию *гетерогенной ядерной РНК (гяРНК)*, впервые выделили в 1961 г. Г.П. Георгиев и его коллеги. Пре-мРНК содержит от 5 000 до 50 000 нуклеотидов, в то время как длина мРНК значительно меньше длины соответствующего предшественника (около 2 000 нуклеотидов). Каждая молекула пре-мРНК обычно дает начало только одной молекуле мРНК, при этом большая часть цепи пре-мРНК (иногда до 90% и более) соответствует некодирующей зоне ДНК и подвергается ферментативному расщеплению до свободных нуклеотидов. Вырезания интронов представляют собой часть процессинга. Синтезированная зрелая, нативная молекула мРНК кодирует только одну полипептидную цепь, то есть является *моноцистронной*.

Процессинг (посттранскрипционная модификация) включает в себя несколько последовательных этапов: 1) отрезание «лишних» концевых последовательностей; 2) расщепление длинных первичных транскриптов и «вырезание» из них участков, транскрибированных с интронов; 3) добавление нуклеотидов к 3'-концу транскрипта (образование поли-А-хвоста); 4) добавление нуклеотидов к 5'-концу транскрипта (например, 7-метилгуанозина); 5) модификацию оснований в транскрипте.

Процессинг протекает в ядре. К 3'-концу пре-мРНК присоединяется (с участием специального фермента) последовательность из 150-200 адениловых нуклеотидов – поли-(А)-фрагмент, к 5'-концевому звену присоединяется *кэп* (7-метилгуанозин). Затем следует процесс вырезания интронов из первичного транскрипта и объединения экзонов с образованием зрелой молекулы мРНК. Вырезание интронов и сшивание экзонов называется *сплайсингом*.

У большинства эукариот сплайсинг катализируют сложные рибонуклеопротеиновые частицы, называемые *сплайсомами*, и специфический фермент. Молекулы РНК этих частиц называются *малыми ядерными РНК (мяРНК)*. мяРНК узнает места соединения интронов и экзонов. Она взаимодействует с концами интронных участков по принципу комплементарности. Это приводит к сближению двух участ-

ков, транскрибированных с соседних экзонов, а участок, транскрибированный с интрона, образует петлю (рис. 15.5).

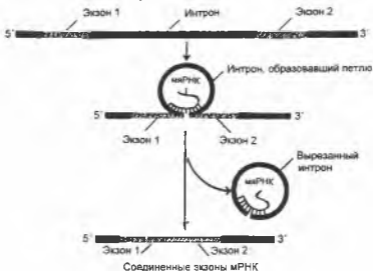


Рис. 15.5. Роль малой ядерной РНК (мяРНК) в сплайсинге [2]

После вырезания интрона специальные лигазы сшивают два конца разрезанной молекулы пре-мРНК, то есть сшивают концы следующих друг за другом экзонов.

В результате процессинга из пре-мРНК получается молекула мРНК, имеющая 5'-кэп-, универсальный 3'-поли-(А)-блок и одну кодирующую последовательность, состоящую из нескольких экзонов, несущих информацию об одной молекуле белка. Для прокариотических клеток процессинг не характерен.

Сплайсинг протекает в эукариотических клетках при биосинтезе как мРНК, так и тРНК, рРНК. Например, сплайсингу подвергаются некоторые тРНК дрожжей, хотя их интроны очень малы по размерам. У дрозофилы гены рРНК также содержат интроны.

Биологическое значение интронов заключается в том, что они облегчают эволюцию, так как новые белки (новые фенотипические признаки) могут появиться в процессе эволюции в результате «тасования доменов».

После того, как из РНК удаляются все интроны и тем самым завершается процессинг предшественника мРНК, зрелая, нативная мРНК покидает ядро. Чтобы сделать это, мРНК сначала связывается

со специальными белками, которые проводят ее в цитоплазму сквозь ядерные поры. Этот комплекс называют *рибонуклеопротеиновым комплексом (РНП-комплексом)*. Предполагают, что ядерные поры, окруженные сложным ансамблем белковых молекул, пропускают из ядра только полностью созревшие мРНК в виде РНП-комплексов. Обрывки РНК, оставшиеся после процессинга, расщепляются нуклеазами и из ядра не выходят.

В цитоплазме обнаруживаются свободные мРНК-частицы (*цитоплазматические информосомы*), или *мРНП*, связанные с полисомами (*полисомные информосомы*). В состав мРНП-частиц входят молекулы мРНК разных размеров. Связанные с полисомами мРНК активно транслируются. В полисомных информосомах обнаруживаются два основных белка.

Переход из ядра в цитоплазму сопровождается сменой белкового компонента РНП-частиц. Белки, связывающиеся с информосомами, маскируют мРНК и обеспечивают ее хранение в цитоплазме в не-транслируемом состоянии. В 1966 г. А.С. Спирин высказал предположение, что информосомы представляют собой форму хранения мРНК в цитоплазме до трансляции. В таком виде, например, хранится в неактивном состоянии мРНК яйцеклетки до оплодотворения, а в семенах до прорастания.

Таким образом, в цитоплазме эукариотических клеток мРНК находится в комплексе с белками. РНП-комплекс – это единственная форма существования мРНК в животной и растительной клетке, от момента синтеза пре-мРНК в ядре до распада мРНК в цитоплазме.

15.2.5. Синтез рибосомных и транспортных РНК

Так же как и мРНК, все рибосомные и транспортные РНК синтезируются на матрице ДНК. У *E. coli* рибосомные РНК образуются в виде большого предшественника 30 S, молекулярная масса которого составляет приблизительно $2 \cdot 10^6$. Эта *прерибосомная РНК* дает начало всем рРНК – 16 S, 23 S, 5 S. При созревании рРНК происходит ее значительное метилирование по специфическим основаниям.

В эукариотических клетках рРНК кодируются областью хромосомы, которая образует ядрышко – *ядрышковый организатор*. Эукариотические 18 S- и 28 S-рРНК образуются в несколько этапов из большой 45 S-прерибосомной РНК. Процессинг 45 S-РНК происходит в ядрышковом организаторе. Сначала происходит метилирование более чем 100 из 14 000 нуклеотидов 45 S-предшественника. Модификации подвергаются главным образом 2'-гидроксильные группы

рибозных остатков. Затем метилированная 45 S-рНК претерпевает ряд ферментативных расщеплений, приводящих к появлению 18 S-, 28 S- и 5,8 S-рНК, характерных для эукариотических рибосом. 5 S-рНК эукариотов синтезируется отдельно.

Эксперименты показали, что в клетках млекопитающих обнаружено 8 различных по размеру пре-рНК (от 45 S до 12 S), поэтому предполагают, что существует, по крайней мере, несколько путей процессинга. Места разрывов предшественника (45 S рНК) одинаковы во всех случаях и их всего пять, но порядок расщепления может отличаться у разных пре-рНК.

Транспортные рНК также транскрибируются в виде рНК-предшественников в результате ферментативного удаления избыточных нуклеотидов с 5'- и 3'-концов молекулы. В некоторых случаях из одной длинной молекулы пре-тРНК в результате ферментативного расщепления образуются две и даже большее число различных тРНК. Например, гены фага Т4 кодируют предшественник сразу двух тРНК – пролиновой и сериновой. Он разрезается на мономеры, от которых отщепляются ненужные для нативных молекул тРНК участки.

Установлено, что в ходе посттрансляционного процессинга пре-тРНК происходят изменения двоякого рода: 1) к некоторым тРНК присоединяется 3'-концевой триплет ЦЦА, тогда как в других тРНК этот 3'-концевой тринуклеотид уже содержится в транскрипте; 2) ряд оснований тРНК специфическим образом модифицируется (метируются, дезаминируются, восстанавливаются). Модифицированные основания встречаются во всех тРНК в определенных положениях.

15.3. Биосинтез белка

Важным этапом на пути экспрессии гена является трансляция синтезированной мРНК. Сборка (синтез) полипептидной цепи из составляющих ее аминокислот называется *трансляцией*. Это очень сложный, многоступенчатый и удивительный процесс, осуществляющийся в соответствии с информацией, заключенной в последовательности нуклеотидов мРНК.

Предполагается, что синтез белка представляет собой самый сложный из биосинтетических процессов, протекающих в живых клетках. Он требует совместного действия почти трехсот макромолекул различных уровней сложности химического строения и пространственной организации.

Синтез белков во всех видах клеток протекает с очень высокой скоростью. Так, на образование полипептидной цепи, состоящей из

100 аминокислотных остатков, рибосоме *E. coli* достаточно 5 секунд. За 1 мин в ретикулоците кролика синтезируется 50 000 молекул глобина, в клетке яйцеводов кур – 600 000 молекул овальбумина, а в гигантской клетке заднего отдела шелкоотделительной железы тутового шелкопряда – $38 \cdot 10^{11}$ молекул фиброина шелка [3]. Синтез различных белков в каждой клетке строго упорядочен, и при данных условиях метаболизма синтезируется лишь необходимое число строго определенных молекул белков.

Изучение процесса трансляции было сопряжено с многочисленными трудностями и охватывает достаточно длительный период. Первые работы, посвященные изучению механизма биосинтеза белков, были выполнены А.Я. Данилевским еще в конце XIX века. В это время была сформулирована гипотеза обращения протеолиза. Позднее появились и другие гипотезы – гипотеза транспептидирования, гипотеза подстановки аминокислот и др.

Очень важные данные получили такие исследователи, как Пол Замечник (установил, что местом синтеза белка из аминокислот являются рибонуклеопротеиновые частицы, то есть рибосомы), Мэл Хогленд (обнаружил, что аминокислоты в присутствии АТФ и специфических ферментов присоединяются к транспортной РНК), Френсис Крик (установил, что тРНК должны выполнять в процессе синтеза белка роль адаптора, то есть одна часть молекулы тРНК может связываться со специфической аминокислотой, а какая-то другая ее часть – узнавать в мРНК триплет, кодирующий данную аминокислоту). Эти открытия привели позднее к выяснению основных принципов и этапов трансляции, установлению генетического кода для аминокислот и созданию матричной схемы биосинтеза белков.

15.3.1. Основные принципы процесса трансляции

Хотя исследования многих авторов показали, что последовательность нуклеотидов нуклеиновой кислоты однозначно определяет порядок расположения аминокислотных остатков в полипептидной цепи (то есть последовательность аминокислот в белке коллинеарна последовательности кодонов в кодирующей ДНК), тем не менее долгое время оставалось не выясненным, каким же образом информация, закодированная в последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК, может реализоваться в виде последовательности аминокислот в молекуле белка.

В 1961 г. Маршалл Ниренберг, Генрих Матте и Филипп Ледер установили нуклеотидную последовательность триплетов для каждой из 20 стандартных аминокислот. Эти кодовые «слова» были проверены множеством разных способов, и был составлен кодовый «словарь» аминокислот. Расшифровка генетического кода явилась крупнейшим научным достижением в области биологии прошлого века.

В процессе транскрипции с определенного гена считывается информация и образуется мРНК. Она представляет собой достаточно длинную молекулу, построенную из нуклеотидов, содержащих четыре разных азотистых основания. Белки синтезируются из 20 различных аминокислот, и последовательность оснований в матрице мРНК определяет последовательность аминокислот в белке. Давно было ясно, что код на базе двух оснований мог бы кодировать только $4^2=16$ аминокислот, а этого недостаточно, так как аминокислот больше. Если же из четырех оснований составить сочетания по три, то можно получить $4^3=64$ различных комбинаций.

Таким образом, код из трех оснований – это минимально необходимое условие в данном случае. Каждую аминокислоту в мРНК кодирует *триплет* азотистых оснований, называемый *кодоном*. Кодоновые триплеты для каждой из аминокислот называются *генетическим кодом*. Триплетность – это одно из свойств генетического кода. Между триплетами нет никаких разделительных сигналов, то есть триплеты следуют один за другим подряд. Это второе свойство генетического кода.

Три кодона были зарезервированы эволюцией в качестве «стоп»-сигналов (*нонсенс-кодона* или *терминирующие кодона*), указывающих белок-синтезирующему аппарату, что синтез белка завершен. Эти три триплета не кодируют аминокислот. Нонсенс-кодона являются теми знаками препинания, которые сигнализируют об окончании трансляции. Это третье свойство генетического кода.

Если в результате случайной мутации стоп-сигнал появится в кодирующей области мРНК, белок – продукт данного гена – образовываться не будет. Если бы таких стоп-триплетов было больше ($64-20=44$), то мутации, приводящие к остановке синтеза белков, встречались бы гораздо чаще. Все оставшиеся ($64-3=61$) триплеты кодируют аминокислоты, и это означает, что одну аминокислоту могут кодировать несколько различных триплетов. Это явление известно как *вырожденность генетического кода* (четвертое свойство генетического кода).

Соответствие кодонов мРНК аминокислотам, то есть собственно *генетический код* представлен в табл. 15.1.

Только две аминокислоты – метионин и триптофан – имеют по одному кодону. Остальные аминокислоты имеют два и более кодонов, например у лейцина и аргинина их 6.

Очень важным свойством генетического кода (пятым по счету) является его *универсальность*, то есть кодовые слова аминокислот одинаковы у всех изученных к настоящему времени про- и эукариотов, а также вирусов. Таким образом, создается впечатление, что все виды растений и животных имели общего эволюционного предшественника с одним генетическим кодом, полностью сохранившимся на протяжении всей биологической эволюции.

Таблица 15.1

Генетический код

Основание 5'-конца	Среднее основание и соответствующая аминокислота								Основание 3'-конца
	У		Ц		А		Г		
У	УУУ	Фен	УЦУ	Сер	УАУ	Тир	УГУ	Цис	У
	УУЦ	Фен	УЦЦ	Сер	УАЦ	Тир	УГЦ	Цис	Ц
	УУА	Лей	УЦА	Сер	УАА	Стоп ²	УГА	Стоп	А
	УУГ	Лей	УЦГ	Сер	УАГ	Стоп	УГГ	Три	Г
Ц	ЦУУ	Лей	ЦЦУ	Про	ЦАУ	Гис	ЦГУ	Арг	У
	ЦУЦ	Лей	ЦЦЦ	Про	ЦАЦ	Гис	ЦГЦ	Арг	Ц
	ЦУА	Лей	ЦЦА	Про	ЦАА	Глн	ЦГА	Арг	А
	ЦУГ	Лей	ЦЦГ	Про	ЦАГ	Глн	ЦГГ	Арг	Г
А	АУУ	Иле	АЦУ	Тре	ААУ	Асн	АГУ	Сер	У
	АУЦ	Иле	АЦЦ	Тре	ААЦ	Асн	АГЦ	Сер	Ц
	АУА	Иле	АЦА	Тре	ААА	Лиз	АГА	Арг	А
	АУГ	Мет ¹	АЦГ	Тре	ААГ	Лиз	АГГ	Арг	Г
Г	ГУУ	Вал	ГЦУ	Ала	ГАУ	Асп	ГГУ	Гли	У
	ГУЦ	Вал	ГЦЦ	Ала	ГАЦ	Асп	ГГЦ	Гли	Ц
	ГУА	Вал	ГЦА	Ала	ГАА	Глу	ГГА	Гли	А
	ГУГ	Вал	ГЦГ	Ала	ГАГ	Глу	ГГГ	Гли	Г

¹ Триплет АУГ является также кодоном, инициирующим транскрипцию.

² Стоп-триплет не кодирует аминокислот.

Можно сформулировать шестое свойство генетического кода – его *однозначность*, то есть один кодон кодирует только одну аминокислоту.

Седьмым и очень важным свойством генетического кода является его *неперекрываваемость*, независимость отдельных триплетов. Ис-

ключения, однако, имеются и из этого правила. Оказалось, что, например, у бактериофага фХ 174 наблюдается сдвиг рамки считывания. Это имеет большое значение для вируса, так как по одной и той же РНК может быть синтезировано много различных белков.

Таким образом, можно выделить несколько основных свойств генетического кода: 1) код триплетен; 2) код вырожден; 3) код универсален; 4) код однозначен; 5) между триплетами нет «знаков препинания»; 6) каждый ген заканчивается стоп-кодоном; 7) рамка считывания не перекрывается.

Важнейшей особенностью всех клеток и процессов трансляции, протекающих в них, является наличие в клетках особых немембранных органелл – *рибосом*, выполняющих функцию синтеза полипептидных цепей. Рибосомы иногда называют механизмами, предназначенными для биосинтеза белков.

Рибосомы видны только в поле электронного микроскопа, так как их размеры очень малы. На электронных микросфотографиях рибосомы видны как плотные округлые гранулы приблизительно сферической формы. Число рибосом в клетке очень велико. Так, у бактерий насчитывается в среднем около 15 000 рибосом, в эукариотических клетках – около 10^6 . Рибосомы локализуются главным образом в цитоплазме, но, кроме того, могут обнаруживаться в ядре (особенно в ядрышке), в митохондриях и хлоропластах.

Рибосомы можно назвать мультимолекулярными агрегатами, состоящими из белков и рРНК. В зависимости от локализации рибосом их делят на три группы: 1) рибосомы прокариотических клеток; 2) рибосомы эукариотических клеток; 3) рибосомы митохондрий и пластид. Эти виды рибосом различаются по молекулярной массе, размерам и соотношению в них белков и рРНК.

Интактные рибосомы (независимо от того, где они находятся) представляют собой комплекс из *двух субъединиц: тяжелой и легкой*. Интактный комплекс может диссоциировать на субъединицы, которые, в свою очередь, могут диссоциировать с образованием рРНК и ряда белков (рис. 15.6). Рибосомы могут реконструироваться.

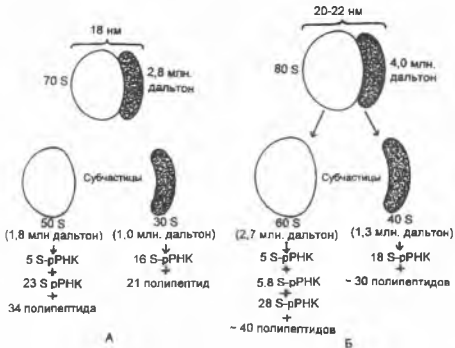


Рис. 15.6. Состав прокариотических (А) и эукариотических (Б) рибосом [2]

Ранее считали, что обе субчастицы рибосом имеют округлую форму. Применение современных электронно-микроскопических методов показало, что конфигурация частиц очень сложная. Малая субчастица изогнута в виде телефонной трубки, а большая напоминает ковш. Предполагают, что в ходе синтеза белка рибосома изменяет свою конформацию.

В состав рибосом могут входить в очень малых количествах такие вещества, как Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , NH_4^+ и другие катионы. Нативные рибосомы сильно гидратированы.

Рибосомы прокариот представляют собой относительно мелкие (30x30x20 нм) комплексы. Они имеют диаметр 18 нм, константу седиментации 70S и молекулярную массу около $2,8 \times 10^6$ Да. 70S рибосомы состоят из малой 30S- (1,0 млн. Да) и большой 50S- (1,8 млн. Да) субчастиц. У *E.coli* 30S-субчастица содержит молекулу 16S рРНК и 21 молекулу различных белков. 50S-субчастица содержит две молекулы нуклеиновой кислоты – 23S рРНК и 5S рРНК и 34 полипептида.

Эукариотические (цитоплазматические) рибосомы образуют крупные (40x40x20 нм) надмолекулярные комплексы. Они имеют диаметр 20-22 нм, константу седиментации 80S и молекулярную массу примерно $4,5 \cdot 10^6$ Да. Как и рибосомы прокариот, они состоят из двух субчастиц. Малая 40S-субчастица (1,3 млн Да) содержит 18S рРНК и около 30 белков. Большая 60S-субчастица (2,7 млн Да) содержит 28S рРНК, 5S рРНК и 5,8S рРНК, а также 41 белок.

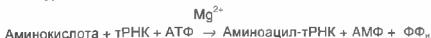
Рибосомы митохондрий можно отнести к классу 70S. Однако они различаются по коэффициентам седиментации у разных групп эукариот. Так, у грибов и зеленых водорослей коэффициент седиментации равен 55-60S, а у высших растений – около 80S.

Рибосомы хлоропластов, напротив, более однородны по этому признаку, коэффициент их седиментации равен 67-70S [4].

15.3.2. Основные этапы трансляции

Процесс белкового синтеза протекает в пять основных этапов, каждый из которых требует определенного набора необходимых компонентов. Наиболее детально описан биосинтез полипептидов в клетках *E. coli*. Он состоит из: 1) активации аминокислот; 2) инициации полипептидной цепи; 3) элонгации; 4) терминации; 5) сворачивания и процессинга белков. В принципе, в эукариотических клетках белковый синтез протекает по той же общей схеме, но отличается от аналогичного процесса у прокариот деталями.

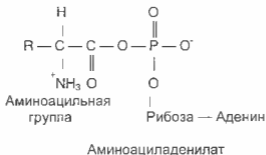
1. *Активация аминокислот.* В данном процессе решается одна из самых важных проблем трансляции, а именно – *сопряжение аминокислоты с ее антикодоном*. На этом этапе биосинтеза белка, протекающем в цитозоле клетки, двадцать стандартных аминокислот присоединяются эфирной связью к соответствующим тРНК. Эти процессы катализируются двадцатью различными ферментами, называемыми *аминоацил-тРНК-синтетазами*. Каждый из этих ферментов специфичен по отношению к какой-то одной аминокислоте и к соответствующей тРНК, то есть ферменты имеют два центра узнавания. Общий вид катализируемой ими реакции может быть выражен следующим уравнением:



Процесс активации (повышение реакционной способности) аминокислот включает в себя две стадии, осуществляемые в каталитическом центре фермента. Двухстадийность необходима, так как

взаимодействие аминокислоты с соответствующей тРНК сталкивается с энергетическим барьером, для преодоления которого сначала используется молекула АТФ, а уже затем происходит соединение аминокислоты с тРНК.

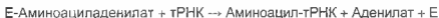
На первой стадии в активном центре фермента происходит взаимодействие АТФ и аминокислоты и образуется связанное с ферментом промежуточное соединение *аминоациладенилат*:



В ходе реакции карбоксильная группа аминокислоты соединяется ангидридной связью с 5'-фосфатной группой АМФ, вытесняя при этом пирофосфат (E – фермент):



На второй стадии аминоацильный остаток переносится с аминоациладенилата, связанного с ферментом, на соответствующую специфическую тРНК:



На этой стадии аминоацильный остаток связывается со свободной 2'- или 3'-гидроксильной группой конечного остатка аденина в молекуле тРНК (рис. 15.7).

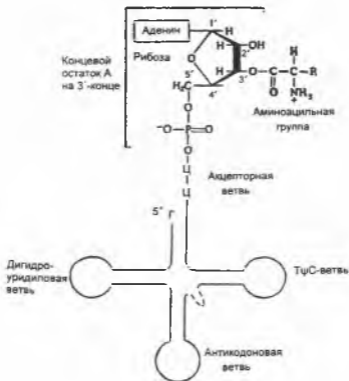
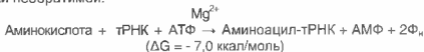


Рис. 15.7. Обобщенная структура аминоацил-тРНК [2]

Эфирная связь между аминокислотой и тРНК является высокоэнергетической; величина ΔG° ее гидролиза составляет приблизительно 7 ккал/моль. Образующийся в процессе активации неорганический пирофосфат гидролизуется *пирофосфатазой* до ортофосфата. Таким образом, на активацию каждой аминокислоты затрачиваются, в конечном счете, две высокоэнергетические фосфатные связи, что делает суммарную реакцию активации аминокислоты практически необратимой:



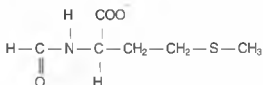
Каждая молекула тРНК может использоваться в качестве «носителя» аминокислоты многократно. Освободившись от предыдущей

молекулы аминокислоты (в процессе трансляции), тРНК становится способной связывать очередную молекулу того же вида аминокислот с помощью соответствующей аминоацил-тРНК-синтетазы.

После присоединения к соответствующей тРНК аминокислота уже не участвует в определении специфичности аминоацил-тРНК, так как сама по себе аминоацильная группа не узнается ни рибосомой, ни мРНК. Специфичность аминоацил-тРНК обеспечивается только структурой тРНК. Таким образом, тРНК играет роль адаптора.

2. *Инициация полипептидной цепи.* Использование методов с изотопной меткой позволило выяснить, что синтез полипептидной цепи начинается с N-конца, к которому один за другим присоединяются аминокислотные остатки, и полипептидная цепь растет в направлении к С-концу.

У всех прокариот начальным, N-концевым аминокислотным остатком, всегда оказывается остаток *N*-формилметионина:

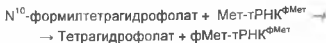


N-формилметионин

В процесс биосинтеза белка он вступает в составе *N*-формилметионил-тРНК (обозначаемой как *фМет-тРНК^{фМет}*). Этот комплекс образуется в результате двух последовательных реакций. Сначала метионин присоединяется с помощью метионил-тРНК-синтетазы к особой иницирующей метиониновой тРНК – тРНК^{фМет}.



Во второй реакции формильная группа при помощи специфической трансформилазы переносится от донора *N*-формилтетрагидрофолата к аминогруппе метионинового остатка:



Существуют два вида тРНК, специфичных к метионину, – тРНК^{Мет} и тРНК^{фМет}. Обе эти тРНК могут присоединять метионин в реакции активации, но приобретать формильную группу и становиться иницирующей аминокислотой метионин способен только в составе метионил-тРНК^{фМет}.

Другая тРНК – метионил-тРНК – используется для встраивания метионина во внутренние участки полипептидной цепи. Блокирование аминогруппы метионина N-формильным остатком препятствует включению такой аминокислоты во внутренние участки цепи, но в то же время позволяет фМет-тРНК^{фМет} связываться с особым местом инициации на рибосоме, с которым не может связываться ни Мет-тРНК^{Мет}, ни любая другая аминоацил-тРНК.

Все полипептиды, синтезируемые на немитохондриальных рибосомах, начинают синтезироваться с остатка метионина, который поступает туда в составе специальной иницирующей метионил-тРНК.

Синтезируемые в митохондриях и хлоропластах белки так же, как и в прокариотических клетках, всегда начинаются с N-формилметионина. Эта особенность белоксинтезирующих аппаратов митохондрий, хлоропластов и бактериальных клеток служит подтверждением точки зрения, согласно которой митохондрии и хлоропласты произошли от бактерий на ранних этапах эволюции эукариотических клеток.

Исследованиями было показано, что инициация синтеза полипептида происходит в несколько стадий. Для инициации полипептидной цепи в клетках прокариот необходимы: 1) 30S-субчастица, содержащая 16S-рРНК; 2) мРНК, кодирующая синтезируемый полипептид; 3) иницирующая N-формилметионил-тРНК^{фМет}; 4) три белка, называемые факторами инициации (IF-1, IF-2 и IF-3); 5) ГТФ.

Образование иницирующего комплекса протекает в три стадии:

1. 30S-рибосомная субчастица связывает фактор инициации 3 (IF-3), который препятствует объединению 30S- и 50S- субчастиц. Затем к 30S-субчастице присоединяется мРНК таким образом, что иницирующий кодон мРНК 5'-АУГ-3' связывается с определенным участком 30S-субчастицы (рис.15.8).

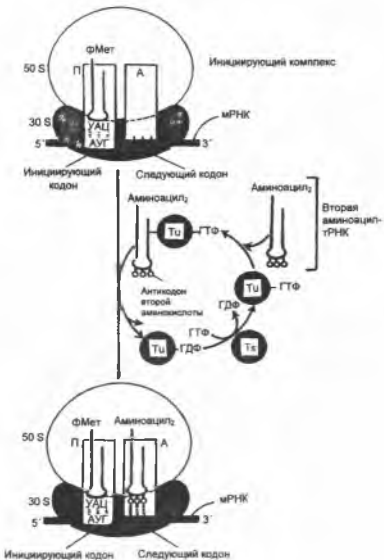


Рис. 15.8. Три стадии процесса образования иницирующего комплекса, протекающего за счет энергии ГТФ до ГДФ и F_i . Буквами П и А обозначают соответственно пептидный и аминокислотный участки рибосомы [2]

Однозначное и правильное расположение иницирующего кодона АУГ на 30S-субчастице обеспечивается особым *иницирующим сигналом*. Он представляет собой участок мРНК, расположенный с 5'-стороны от кодона АУГ. Этот сигнал состоит преимущественно из 6-8 остатков А и Г. Он узнается комплементарной последовательностью 16S-рРНК 30S-субчастицы, и благодаря этому мРНК прочно фиксируется в нужном для инициации трансляции положении. Поскольку и для иницирующих, и для внутренних остатков метионина существует всего лишь один кодон, иницирующий сигнал с 5'-стороны от АУГ указывает место, с которым надлежит связаться фМет-тРНК^{фМет}. Внутренние кодоны АУГ специфичны по отношению к Мет-тРНК^{фМет} и не способны связывать фМет-тРНК^{фМет}.

2. Второй этап заключается в том, что размер комплекса, состоящего из 30 S-субчастицы, IF-3 и мРНК, увеличивается в результате соединения с фактором инициации IF-2, уже связанного с ГТФ и с иницирующей N-формилметионил-тРНК^{фМет}, которая попадает точно на иницирующий кодон.

3. На последней стадии инициации этот большой комплекс взаимодействует с 50 S-рибосомной субчастицей. Одновременно молекула ГТФ, связанная с IF-2, гидролизуется до ГДФ и фосфата, которые высвобождаются из комплекса. Факторы инициации IF-3 и IF-2 также отсоединяются и покидают рибосому. Теперь остается функционально активная 70 S-рибосома, которая называется *иницирующим комплексом*. Она содержит мРНК и иницирующую N-формилметионил-тРНК^{фМет}. Правильное положение N-формилметионил-тРНК^{фМет} в полном 70 S-иницирующем комплексе обеспечивается двумя точками узнавания и связывания.

Во-первых, антикодоновый триплет иницирующей аминоксил-тРНК образует комплементарные пары с антипараллельно расположенным кодоновым триплетом АУГ в мРНК.

Во-вторых, иницирующая аминоксил-тРНК присоединяется к пептидильному (П-участку) рибосомы. В рибосоме имеется два участка связывания аминоксил-тРНК: 1) аминокислотный участок (А-участок); 2) пептидильный участок (П-участок).

Они образованы благодаря специфическому сочетанию областей 30S- и 50S-субчастиц. Иницирующая фМет-тРНК может связываться только с П-участком (рис. 15.8), однако, это исключение. Все остальные вновь поступающие аминоксил-тРНК присоединяются к А-участку, тогда как П-участок — это такое место рибосомы, с которого уходят освободившиеся от аминокислот тРНК. К этому же участку оказывается прикрепленной растущая пептидил-тРНК. Иницирующий комплекс теперь подготовлен к процессу элонгации.

Таким образом, сборка активной рибосомы идет с разрывом одной макроэргической связи. Выделившаяся при этом энергия обеспечивает термодинамический стимул для протекания процесса в нужном направлении – элонгации белка.

3. *Элонгация полипептидной цепи.* После инициации начинается основной этап трансляции – процесс элонгации. Присоединение каждого аминокислотного остатка к растущей полипептидной цепи происходит в *три стадии*, и этот процесс повторяется столько раз, сколько остатков следует присоединить. То есть можно сказать, что элонгация имеет циклический характер.

Для осуществления процесса элонгации необходимы различные комплексы и отдельные вещества: 1) образовавшийся ранее иницирующий комплекс; 2) следующая аминоацил-тРНК, соответствующая следующему триплету мРНК; 3) три растворимых белка цитозоля, называемых *факторами элонгации* (*EF-Tu, EF-Ts, EF-G*); 4) ГТФ. Факторы элонгации часто обозначают просто *Tu, Ts* и *G*.

На первой стадии цикла элонгации (рис. 15.9) сначала происходит связывание следующей аминоацил-тРНК с комплексом, состоящим из фактора элонгации *Tu* и молекулы ГТФ.

Образующийся тройной комплекс *аминоацил-тРНК-Tu-ГТФ* соединяется с 70S-иницирующим комплексом. Одновременно происходит гидролиз ГТФ. Комплекс *Tu-ГТФ* покидает 70S-рибосому, после чего с помощью ГТФ и фактора *Ts* комплекс *Tu-ГТФ* восстанавливается до *Tu-ГТФ*.

Затем с А-участком рибосомы связывается новая аминоацил-тРНК. Это происходит за счет комплементарного антипараллельного взаимодействия между антикодоном новой аминоацил-тРНК и соответствующим кодоном матричной РНК. Точное соответствие аминоацил-тРНК кодону мРНК проверяется с помощью еще одного специфического контакта внутри А-участка между другой частью молекулы тРНК и рРНК. Следующая стадия элонгации наступает только в том случае, если оба взаимодействия оказываются правильными.

На второй стадии цикла элонгации образуется новая пептидная связь между аминокислотами, чьи тРНК расположены в А- и П-участках рибосомы. Этот процесс осуществляется в результате переноса иницирующего N-формилметионинового остатка от несущей его тРНК к аминокислоте новой аминокислоты, которая только что попала в А-участок. Этот перенос катализируется *пептидилтрансферазой* (особым белком, входящим в состав 50S-субчастицы). В результате этой реакции в А-участке образуется дипептидил-тРНК, а в П-участке остается ненагруженная иницирующая тРНК^{ФМет}.

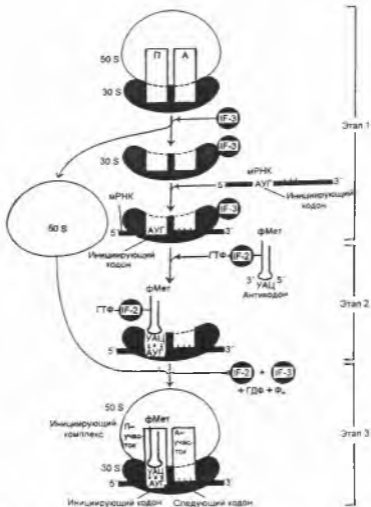


Рис. 15.9. Первая стадия элонгации – связывание второй аминоксил-тРНК, которая поступает в рибосому в комплексе с фактором элонгации T_i , содержащим связанный ГТФ. Присоединение второй аминоксил-тРНК сопровождается гидролизом связанного ГТФ. Образующийся при этом связанный ГДФ вновь превращается в ГТФ в ходе реакции, катализируемой фактором элонгации T_s . Нуклеотиды антикодона следующей аминокислоты обозначены кружками [2]

На последней стадии цикла элонгации рибосома перемещается вдоль мРНК по направлению к ее 3'-концу на расстояние в один кодон (то есть на один триплет). Дипептидил-тРНК по-прежнему остается связанной со вторым кодоном мРНК, и поэтому движение рибосомы приводит к перемещению дипептидил-тРНК из А-участка в П-участок, в результате чего предыдущая (уже свободная) тРНК отделяется от П-участка и уходит в цитозоль. Теперь в А-участке находится третий кодон мРНК, а второй кодон оказывается в П-участке. Передвижение рибосомы вдоль мРНК называется *транслокацией*. На этой стадии необходим фактор элонгации G (называемый также ферментом *транслоказой*) и гидролиз еще одной молекулы ГТФ (рис. 15.10).

Полагают, что на этой стадии происходит изменение конформации всей рибосомы, способствующее передвижению ее по мРНК к следующему кодону в направлении к 3'-концу матрицы. Процесс транслокации обеспечивается энергией за счет гидролиза ГТФ.

На этом один цикл элонгации заканчивается и начинается очередной цикл. Удлинение пептидной цепи на один аминокислотный остаток требует расхода двух молекул ГТФ. Многократное повторение таких циклов приводит к включению в синтезирующуюся полипептидную цепь аминокислотных остатков в полном соответствии со всеми кодонами в мРНК.

4. *Терминация синтеза полипептида*. После того, как рибосома присоединила последнюю аминокислоту, она полностью закончила синтез полипептида, кодируемого мРНК. Сигналом об окончании трансляции служит появление в рибосоме одного из трех терминирующих кодонов мРНК (УАА, УАГ, УГА), расположенного непосредственно за кодоном последней аминокислоты. Терминирующие триплеты не кодируют никакую аминокислоту.

Терминирующий кодон узнается уже не антикодоном аминоацил-тРНК, а *белковыми факторами терминации* (R_1 , R_2 и S). Эти белки способствуют гидролитическому отщеплению полипептида от конечной тРНК и его высвобождению, затем обеспечивают отделение от П-участка последней, теперь уже «пустой» тРНК и, наконец, приводят к диссоциации 70S-рибосомы на 30S- и 50S-субчастицы, готовые к синтезу новой полипептидной цепи.

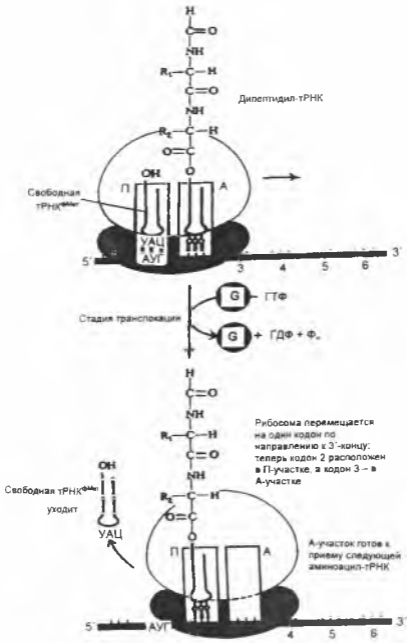


Рис. 15.10. Стадия транслокации [2]

Рассмотренный выше пример синтеза белковой молекулы предполагал наличие только одной рибосомы. Однако одну цепь мРНК, как правило, транскрибируют сразу несколько рибосом. Как только первая рибосома удаляется от 5'-нетранскрибируемого участка на достаточное расстояние, он становится доступным для следующей рибосомы. В дальнейшем формируется комплекс рибосом, соединенных с одной цепью мРНК. Такой комплекс называется *полисомой* (*полирибосомой*), рибосомы которого постепенно продвигаются к 3'-концу мРНК. Количество рибосом зависит от длины мРНК. Скорость движения рибосом по мРНК в клетках прокариот составляет 20-60 нуклеотидов в секунду, а в эукариотических клетках – от 2 до 16 нуклеотидов в секунду.

Для поддержания процесса синтеза белка необходим большой термодинамический вклад, так как на образование пептидной связи затрачивается не менее 29,2 ккал энергии фосфатной группы, а стандартная свободная энергия ее гидролиза составляет всего около -5,0 ккал. Таким образом, чистая затрата энергии на синтез одной пептидной связи составляет -24,2 ккал/моль. Столь высокий расход энергии служит одним из важных факторов, обеспечивающим почти совершенную точность биологического перевода генетической информации мРНК на язык аминокислотной последовательности белков.

5. *Процессинг и сворачивание полипептидных цепей.* Известно, что белок остается биологически неактивным до тех пор, пока он не приобретет присущую ему нативную конформацию. Нативная пространственная укладка полипептидной цепи определяется ее аминокислотной последовательностью.

В определенный момент времени белок самопроизвольно принимает свою нативную конформацию, то есть линейная или одномерная генетическая информация, содержащаяся в матричной РНК, преобразуется в специфическую трехмерную структуру новосинтезированного полипептида. Чаще всего новообразованная полипептидная цепь принимает окончательную биологически активную конформацию только после того, как она подвергнется *процессингу* или *ковалентной модификации*. Изменения в ходе этих процессов получили название *посттрансляционной модификации*. У различных белков процессинг протекает по-разному.

Можно выделить несколько типов ковалентной модификации белков: 1) удаление сигнальных последовательностей; 2) модификации N-конца и C-конца; 3) фосфорилирование; 4) метилирование; 5) карбоксилирование; 6) гликозилирование; 7) образование дисульфидных мостиков; 8) добавление простетических групп и др.

Некоторые белки содержат на N-конце дополнительную полипептидную последовательность из 15-30 остатков (*сигнальную последовательность*), которая направляет этот белок к месту его назначения в клетке. Такие сигнальные последовательности удаляются с помощью особых пептидаз, расположенных в мембранах внутриклеточных структур.

Как уже отмечалось ранее, в прокариотических клетках все полипептиды начинаются с остатка N-формилметионина, а в эукариотических – с остатка метионина. Однако этот первый аминокислотный остаток и несколько следующих за ним иногда удаляются с помощью особых ферментов, и, таким образом, в нативном белке они не обнаруживаются.

В некоторых белках после трансляции может ацетилироваться аминокислотная группа N-концевого остатка, в других модификация ацетилированию подвергается C-концевой остаток.

В составе некоторых белков гидроксильные группы сериновых, треониновых и тирозиновых остатков подвергаются ферментативному фосфорилированию, как правило, с участием АТФ. Возникновение фосфосериновых, фосфотреониновых и фосфотирозиновых остатков в этих белках приводит к увеличению их отрицательного заряда. Например, в казеине (белке молока) содержится много фосфосериновых остатков, функция которых состоит в связывании ионов Ca^{2+} . Поскольку ионы Ca^{2+} , и фосфат, а также аминокислоты необходимы грудным детям, казеин молока представляет собой источник этих трех незаменимых питательных веществ. Фосфорилирование гидроксильных групп определенных остатков серина необходимо для активации некоторых ферментов, например гликогенфосфоорилазы. Фосфорилирование специфических остатков тирозина некоторых белков оказалось важным этапом в процессе превращения нормальных клеток в раковые.

Остатки лизина в некоторых белках подвергаются ферментативному метилированию. Остатки монометил- и диметиллизина обнаружены в некоторых мышечных белках и в цитохроме с. В других белках метилированию подвергаются карбоксильные группы некоторых остатков глутаминовой кислоты, что приводит к нейтрализации их отрицательных зарядов.

К остаткам аспарагиновой и глутаминовой кислот в ряде белков могут присоединяться дополнительные карбоксильные группы. Например, протромбин (белок системы свертывания крови) содержит в своей N-концевой области несколько остатков γ -карбоксиглутами-

новой кислоты. Карбоксильные группы связывают ионы Ca^{2+} , необходимые для запуска механизма свертывания крови.

Боковые углеводные цепи гликопротеинов ковалентно присоединяются к полипептиду во время (*котрансляционно*) или после синтеза последнего (*посттрансляционно*). В гликопротеинах боковая углеводная цепь может прикрепляться к остаткам аспарагиновой кислоты, серина или треонина. Многие белки, которые работают вне клетки, а также протеоглики, покрывающие слизистые оболочки, содержат боковые олигосахаридные цепи. В олигосахаридных фрагментах таких белков, как правило, присутствуют глюкоза, галактоза, глюкозамин, галактозамин, нейраминная кислота, а иногда и фукоза.

Во многих белках в процессе формирования их нативной конформации появляются поперечные сшивки в результате ферментативного образования дисульфидных мостиков между остатками цистеина с образованием молекулы цистина. Поперечные дисульфидные мостики очень прочные и помогают уберечь нативную конформацию белковой молекулы от денатурации. Известны природные токсины (компоненты ядов змей), содержащие 2-4 дисульфидные связи, выдерживающие кипячение в присутствии 8 М мочевины в течение 24 часов и не теряющие свою активность после такого жесткого воздействия.

В состав многих ферментов и других биологически важных соединений входят обязательные для их активности ковалентно связанные с белком простетические группы; они также присоединяются к полипептидной цепи после того, как та покидает рибосому. Примерами таких простетических групп могут служить молекула биотина, ковалентно связанная с ацетил-СоА-карбоксилазой, и гемовая группа цитохрома с.

Кроме ковалентной модификации, большинство белков подвергается пространственной укладке (*фолдингу*). Этому сложному процессу способствует особая группа белков, названная *шаперонами* [7].

Шапероны – это семейство специализированных внутриклеточных белков, обеспечивающих быстрое нахождение правильной пространственной структуры какого-либо вновь синтезированного белка. Они могут узнавать и связываться с частично свернутыми (или развернутыми) белками. При выходе из рибосомы в белке могут происходить «ошибочные» взаимодействия, например между гидрофобными участками. Это будет препятствовать правильному сворачиванию молекулы. Предполагается, что связывание шаперонов с подобными участками стабилизирует частично свернутую молекулу до того момента, пока не установятся правильные контакты в белке. Это означает, что шапероны должны диссоциировать от полипептида и что после

диссоциации существует благоприятная возможность завершения правильного фолдинга. Хотя детали этого механизма остаются неясными, очевидно, что шапероны играют важную роль в фолдинге полипептидных цепей. О сложности системы свидетельствует и необходимость АТФ для диссоциации шаперонов от полипептидной цепи. Установлено, что шапероны имеют отношение к кинетике процесса фолдинга, а не к конечной свернутой форме белка, которая определяется аминокислотной последовательностью.

15.3.3. Перемещение белков в клетке

Установлено, что существуют белки, которые после завершения синтеза, ковалентной модификации и фолдинга остаются в цитозоле, где включаются в метаболизм клетки. Другие белки направляются к внутриклеточным компартментам. Некоторые белки экспортируются клеткой, а некоторые, встроившись в какую-либо мембрану, начинают функционировать как транспортные системы, рецепторы, ферменты.

Большинство белков на N-конце полипептидной цепи имеют некоторую специфическую последовательность аминокислотных остатков, выполняющих роль сигналов, направляющих тот или иной белок к соответствующему месту назначения. Такие лидеры узнаются особыми рецепторами мембран, связываются с ними и благодаря наличию гидрофобных аминокислотных остатков проходят через мембрану. Таким образом, например, проходят в полость эндоплазматического ретикулума многие белки, предназначенные клеткой на экспорт. Попавшие в полость ретикулума белки претерпевают ряд модификаций (отщепляется сигнальный пептид, происходит гликозилирование и пр.), затем направляются в аппарат Гольджи (здесь завершается «созревание» белков), откуда в составе секреторных везикул выводятся за пределы клетки. Подобный путь проходят некоторые белки, секретируемые поджелудочной железой. Многие другие экспортируемые белки, функционирующие вне клетки, – белки плазмы крови, полипептидные гормоны, антитела, мукопротеины – могут поступать к месту своего назначения аналогичным путем.

ГЛАВА ШЕСТНАДЦАТАЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ БИОМЕМБРАН

16.1. Строение мембран

Возникновение первой клетки в ходе эволюции Земли стало возможно лишь тогда, когда появилась полупроницаемая перегородка, окружившая некоторое пространство с находящимися в нем компонентами. Такая первичная клетка должна была иметь возможность обмениваться с окружающей средой веществом, информацией и энергией, то есть приобрести свойства открытых систем. Способностью избирательно пропускать вещества обладает единственная надмолекулярная структура – мембрана. Существуют вещества, которые могут спонтанно образовывать замкнутые мембраноподобные структуры даже при простом встряхивании их с водой. Если предположить, что сборка первых мембран происходила в водной среде (Мировом океане) спонтанно, а некоторые самореплицирующиеся комплексы (предположительно РНК) оказывались внутри таких везикул, то далее можно ожидать не только функционирование возникших надмолекулярных комплексов, но их эволюцию, вплоть до появления первых истинных прокариотических клеток [1, 2].

Все без исключения биомембраны построены по единому принципу: двойной слой амфифильных липидов (в водной среде такие молекулы могут самопроизвольно образовывать бислои, так как обладают гидрофильными и гидрофобными группами) и взаимодействующие с ним (на его поверхности или внутри него) белки. С липидами и белками могут соединяться углеводы, образуя сложные соединения – *гликоконъюгаты*.

Следовательно, основными компонентами биомембран являются липиды, белки и углеводы. Минорными компонентами считаются нуклеиновые кислоты, полиамины и неорганические ионы. В мембранах обнаруживается относительно большое количество (около 30% всего веса) невымержающей (связанной) воды.

Основу биологических мембран составляет уникальная группа веществ, способных к спонтанной организации везикул (липосом или мицелл) различных диаметров. Этими веществами являются полярные липиды, называемые *амфипатическими* соединениями (то есть обладающие и гидрофобными, и гидрофильными свойствами).

Как было сказано выше, липиды расположены в мембране двумя слоями (*двухслойная структура*). Каждый (моно) слой состоит из

липидов, расположенных таким образом, что неполярные гидрофобные «хвосты» молекул находятся в тесном контакте друг с другом. Взаимодействие между гидрофобными «хвостами» усиливается ван-дерваальсовыми взаимодействиями, что существенно уменьшает свободную энергию структуры и, следовательно, значительно повышает ее стабильность. Полярные «головы» таких липидов обращены в гидрофильную среду и взаимодействуют не только друг с другом, но и с веществами, находящимися в окружающей среде.

Все виды взаимодействий имеют исключительно нековалентный характер. Два монослоя в биомембранах ориентируются «хвост к хвосту» таким образом, что образуется структура двойного слоя, имеющего неполярную внутреннюю часть и две полярные поверхности. Толщина бислоя липидов (без белков) составляет примерно 5,3 нм. За счет белков толщина мембраны увеличивается до 10 нм.

Установлено, что в составе мембран присутствуют три основных класса липидов: 1) *фосфолипиды* (составляющие 80-90% от общего количества липидов мембран); 2) *гликолипиды* (до 6-10%); 3) *стероиды* (до 2-5%).

Полярную «голову» фосфолипидов формируют последовательно связанные друг с другом полярные соединения: остатки холина (или этаноламина, или серина, или инозита), фосфорной кислоты и трехатомного спирта глицерола. Остатки жирных кислот образуют гидрофобные «хвосты», соединенные с глицеролом (см. главу "Липиды").

Фосфолипиды – это вещества, различающиеся химической природой и полярных «голов», и гидрофобных «хвостов». Так, их можно разделить на: а) *глицерофосфолипиды* (производные фосфатидной кислоты – фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит) и б) *сфингофосфолипиды* (производные церамида, сфингомиелины). Благодаря наличию перечисленных выше гидрофильных «голов», фосфолипиды могут нести определенный заряд. Отличия также касаются и жирнокислотных остатков. Чаще всего в состав фосфолипидов входит насыщенная жирная кислота – пальмитиновая (C_{16}), и ненасыщенная – олеиновая ($C_{18:1}$). Но в мембранах не так уж мало фосфолипидов, содержащих ацильные цепи и других жирных кислот (линолевой, стеариновой и др.) [3, 4].

В составе некоторых мембран обнаружены такие фосфолипиды, как *кардиолипины* (две фосфатидные кислоты, связанные друг с другом через глицерол и имеющие 4 ацильных «хвоста»).

Гликолипиды мембран содержат остаток сфингозина (двухатомный аминспирт, соединенный с C_{18} -жирной кислотой, имеющей двойную связь), а в состав гидрофильной «головки» входит какой-

либо углеводов. В составе гликолипидов встречаются редкие жирные кислоты – цереброновая и нервоновая. Гликолипиды представлены в основном тремя группами веществ: 1) *цереброзидами* (углеводным компонентом являются галактоза или глюкоза), 2) *сульфатидами* и 3) *ганглиозидами* (углеводная часть представлена разветвленными олигосахаридами).

Стероиды мембран, построенные на основе стеранового скелета, представлены в основном *холестерином* (у животных), *ситостерином* и *стигмастерином* (у высших растений), *эргостерином* (у грибов). Холестерол имеет интересное строение – небольшую полярную группу (—ОН) и большой гидрофобный «хвост» в виде четырех замкнутых колец. Такое строение определяет слабые амфипатические свойства и уникальную функцию холестерина. Так, холестерол, внедряясь своей гидрофобной частью между ацильными цепями других липидов, приводит к менее плотной упаковке ненасыщенных жирнокислотных цепей и, как следствие, к уменьшению вязкости и увеличению текучести мембраны. В свою очередь, снижение вязкости способствует латеральному перемещению липидов. Однако ОН-группа определяет противоположный эффект – она стабилизирует гидрофильные части мембраны и делает тем самым мембрану менее подвижной и менее проницаемой для небольших молекул.

Мембраны различных клеток и внутриклеточных компартментов отличаются качественным и количественным липидным составом, что определяет свойства и функции данных биомембран.

С соответствии с современными данными, структурная организация мембран может быть описана *жидкостно-мозаичной моделью*, предложенной Дж. Сингером и Г. Николсоном в 1972 г. Согласно данной модели мембрана – это подвижная мозаика, образованная вязкой липидной фазой (бислоем) и погруженными в нее белками (рис. 16.1).

Мембранные белки отличаются и свойствами, и функциями. Следует отметить, что белки биомембран часто классифицируют в основном по их гидрофобности и, как следствие, по степени их погруженности в бислой липидов. В этой связи все многообразие мембранных белков принято делить на две группы: 1) *периферические (поверхностные)* и 2) *интегральные (погруженные в толщу мембраны)*.

К первой группе относятся белки, ассоциированные с мембраной за счет ионных взаимодействий (ацетилхолинэстераза, фибронектин, спектрин и др.). Периферические белки легко извлекается из мембран (например, с помощью растворов солей).

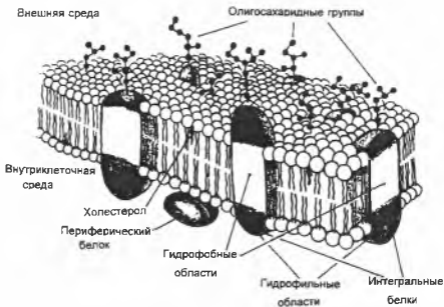


Рис. 16.1. Жидкостно-мозаичная модель структуры мембран

Вторая группа мембранных белков (интегральные) образует комплексы с липидами мембраны в основном за счет гидрофобных взаимодействий. Некоторые интегральные белки лишь частично проникают в бислой, а некоторые – пронизывают его насквозь. Такие белки отделяются от липидов мембран (солюбилизируются) только при применении детергентов, органических растворителей (например, тритоном X-100, додецилсульфатом натрия, дезоксихолатом). Интегральные белки можно разделить на три группы в зависимости от степени погруженности в мембрану: 1) *монотопические* (частично погружены в бислой, не пронизывают его насквозь); 2) *битопические* (пронизывают бислой, но не образуют петель и складок внутри мембраны); 3) *политопические* (пронизывают мембрану неоднократно, образуя петли как внутри мембраны, так и по обе стороны от нее).

Соотношение белков и липидов в мембранах колеблется от 1:5 до 3:1. Содержание веществ зависит от происхождения, строения и функции конкретных мембран.

Одним из важных свойств биомембран является их обязательная *асимметрия*. Наружная и внутренняя поверхности мембран различаются по химическому составу и строению. В наружном слое, как

правило, локализованы белки и липиды, ковалентно связанные с углеводами (гликопротеиды, протеогликаны и гликолипиды). Некоторые белки (например, рецепторы клеточных мембран) всегда локализованы только в наружном слое мембран. Однако в большинстве эукариотических клеток только во внутреннем слое плазмалеммы имеются белки, тесно связанные с цитоскелетом этих клеток. Фосфолипидный состав мембран всегда асимметричен.

Степень асимметрии белкового и липидного состава монослоев различна для разных мембран. Она возникает на самых ранних стадиях формирования мембран и может меняться по мере участия клетки в разных процессах и по мере ее старения. Асимметрия биомембран, наряду с подвижностью мембранных компонентов, определяет многообразные функции, характерные для мембран.

Кроме асимметрии, для всех без исключения биомембран характерны такие свойства, как *подвижность* (или *жесткость*) и *текучесть* бислоя липидов мембран, определяемые типом и длиной углеводородных группировок, входящих в состав жирных кислот и сфингозинов, а также содержанием холестерина. Как правило, повышенная жесткость определяется увеличенным соотношением насыщенных и ненасыщенных ацильных цепей, повышенным содержанием холестерина, типом и расположением специфических белков (с высоким содержанием гидрофобных аминокислот) и температурой окружающей среды [5, 6].

Безусловно, наиболее подвижными компонентами мембран являются липиды (но не холестерол), которые способны совершать много различных типов движений: вращательное, латеральное, переход из одного слоя мембраны в другой, перемещение жирнокислотных «хвостов» друг относительно друга и некоторые другие.

Белки также способны к различного рода перемещениям, но их подвижность весьма ограничена. Белковые молекулы не абсолютно свободно перемещаются в плоскости мембраны, поскольку могут существовать взаимодействия между белками и углеводами, отдельными белковыми молекулами и, кроме того, между белками мембран и цитоскелетом клетки: структурными белками, микрофиламентами, микротрубочками, примыкающими к мембране изнутри. В свою очередь, расположение белковых молекул в мембране оказывает влияние на распределение и ориентацию липидных молекул в зависимости от сродства конкретных белков и липидов. Особенно это касается анулярного слоя липидов, который непосредственно примыкает к белковой глобуле.

Благодаря особым белкам плазматических мембран эукариотических клеток (коннексонам) клетки могут не только узнавать друг друга, но и связываться, образуя непрерывный канал, соединяющий цитоплазмы двух клеток.

Прокариотические клетки имеют ограниченное количество различных мембранных структур (плазматическую мембрану и мезосомы – участки наружной мембраны, инвагинированной внутрь клетки). Эукариотические клетки имеют значительно больше разнообразных внутриклеточных мембранных образований (плазматическая мембрана; наружные и внутренние мембраны оболочек ядра, митохондрий и пластид; мембраны аппарата Гольджи, эндоплазматическая сеть, образованная системой каналов и цистерн, окруженных мембраной; мембраны лизосом и пероксисом).

16.2. Функции мембран

В зависимости от особенностей химического состава и строения мембранам присущи различные функции: 1) *компартиментализационная* (функция *отграничения*); 2) *рецепторная*; 3) *защитно-механическая*; 4) *транспортная*; 5) *адгезивная*; 6) *трансмембранной передачи сигнала* и др.

Некоторые белки мембран способны выполнять *ферментативную* функцию, а другие – служить *эффекторами* (являясь ионными каналами и изменяя свою функцию при связывании лиганда с рецептором). Кроме того, мембраны активно участвуют в процессах метаболизма клеток, их роста и деления; обеспечивают не только связывание лиганда с клеткой, но передают информацию внутрь клетки (система вторичных мессенджеров); определяют антигенные свойства клеток.

Одной из важнейших функций биомембран, как уже отмечалось ранее, является регуляция транспорта веществ внутрь и наружу клетки, а также их транспорт между цитоплазмой и различными субклеточными органеллами. Биомембраны являются полупроницаемыми барьерами. В зависимости от конкретного соединения и вида мембраны могут существовать различные виды переноса веществ.

Для переноса низкомолекулярных веществ в мембранах существуют три механизма: 1) *простая диффузия*; 2) *облегченная диффузия*; 3) *активный транспорт*.

Так, небольшие нейтральные молекулы (H_2O , CO_2 , O_2) и низкомолекулярные гидрофобные органические молекулы (мочевина, жирные кислоты) могут проникать через мембраны за счет *простой*

диффузии. Скорость диффузии вещества в данном случае будет определяться его растворимостью в мембране, коэффициентом диффузии и разностью концентрации вещества по разные стороны мембраны (градиентом концентраций). При наличии разности концентрации вещества движение молекул осуществляется из области повышенной в область пониженной его концентрации. После выравнивания концентраций веществ диффузия прекращается. Поток веществ по градиенту концентрации, осуществляемый без затраты энергии и без связывания с каким-либо мембранным белком, является частным случаем *пассивного транспорта* [1, 4, 5].

Другим примером пассивного транспорта служит *облегченная диффузия* – когда диффузия может облегчаться вследствие участия в этом процессе молекулы носителя (обычно мембранного белка – *транслоказы*), но будет осуществляться тоже по направлению градиента своей концентрации. Транслоказы могут действовать как постоянно открытые гидрофильные каналы; как каналы, открывающиеся только после связывания со специфическим лигандом; путем захвата лиганда и последующего поворота на 180° в плоскости мембраны. С помощью облегченной диффузии переносятся такие вещества, которые не способны пройти через мембрану посредством простой диффузии (Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- и др.).

Облегченная диффузия отличается от простой не только большей скоростью, но и способностью к насыщению. Увеличение скорости переноса веществ происходит пропорционально росту градиента концентрации только до определенных пределов.

Если перенос веществ осуществляется с помощью специфических переносчиков, но требует *затраты энергии клеткой*, то такой процесс называется *активным транспортом*. Это всегда имеет место, если перенос осуществляется *против градиента концентрации*. Необходимая для этого энергия, как правило, поставляется в виде АТФ, однако известны и другие источники энергии (окислительно-восстановительные реакции, например, в митохондриях).

С помощью активного транспорта через мембрану проходят такие вещества, как анионы, сахара, аминокислоты и др.

Более крупные молекулы (белки, нуклеиновые кислоты, олигосахариды и другие высокомолекулярные соединения), а также небольшие частицы способны проходить через мембраны только в составе мембранного пузырька. В зависимости от того, в каком направлении осуществляется транспорт, различают *эндоцитоз* (фагоцитоз и пиноцитоз) и *экзоцитоз* (секреция, экскреция и рекреция).

В мембранах достаточно много белков, которые участвуют в передаче сигналов от одних клеток к другим. Способность клеток проводить сигналы (в виде электрических импульсов) наиболее ярко выражена в нервных волокнах. Проведение электрических сигналов по возбудимой мембране обеспечивается благодаря способности поддерживать разность концентрации ионов по обе стороны мембраны. Интегральный белок мембран – Na^+ , K^+ -зависимая АТФаза – является переносчиком ионов через мембрану против градиента их концентрации (ионы Na^+ выкачиваются из клетки, а ионы K^+ накачиваются внутрь); при этом используется энергия АТФ. За счет распада одной молекулы АТФ происходит выкачивание трех ионов Na^+ и одновременное закачивание в клетку двух ионов K^+ .

Поскольку обмен K^+ и Na^+ происходит в неэквивалентных количествах (K^+ поступает внутрь клетки меньше), то это приводит к тому, что внутренняя сторона клеточной мембраны становится заряженной электроотрицательно по отношению к наружной поверхности. Разность потенциалов между внешней и внутренней сторонами мембраны называется *потенциалом покоя*.

При возбуждении нервного волокна избирательно увеличивается проницаемость клеток для ионов натрия. Вследствие этого катионы натрия поступают внутрь клетки и клеточная мембрана *деполяризуется*. Деполяризация сопровождается распространением по поверхности мембраны затухающего электрического сигнала. Такая локальная деполяризация мембраны происходит в коротких отростках нервных клеток (дендритах) и в мембранах ряда других клеток.

В длинных отростках нервных клеток (аксонах) проведение импульса обусловлено развитием *потенциала действия*, связанного с перезарядкой мембраны (внутренняя поверхность приобретает положительный заряд по отношению к наружной). Длительность потенциала действия составляет 1 мс, после чего происходит его падение вследствие нарастания компенсирующего потока ионов K^+ наружу из клетки.

После проведения импульса в клетке восстанавливается состояние покоя. Химическая природа процессов, изменяющих проницаемость мембран для ионов, пока неясна. При передаче возбуждения определенную роль могут играть и другие ионы, например Ca^{2+} .

В природе имеются вещества (алкалоиды наперстянки), способные конкурировать с ионами K^+ за связывание с транслоказой и тем самым тормозить действие Na^+ , K^+ -насоса.

ГЛАВА СЕМНАДЦАТАЯ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СОКРАЩЕНИЯ МЫШЦ

17.1 Двигательные функции биосистем

Одним из характерных проявлений жизни является подвижность. Движение в клетке – это не только диффузия или перемещения, связанные с токами цитоплазмы. Субмикроскопическая канальцевая система, соединяющая ядро, митохондрии и другие структуры, направленным образом передвигает в клетке вещества, открывая и закрывая соответствующие протоки. Сократительные процессы в хвостах фаговых частиц, механохимические процессы в мембранах, перемещение рибосом относительно матричной РНК в полисомах, локомоции сперматозоидов, а также яйцеклеток губок и кишечнотелных – все это и многое другое является своеобразным проявлением двигательных функций в биологических системах.

В сократительной активности практически всех эукариотических клеток принимают участие эволюционно древние белки актин и миозин. Они обеспечивают разнообразные перемещения цитоплазмы внутри клетки, транспорт и секрецию из клеток ферментов и гормонов, двигательные реакции, связанные с делением ядерного материала, миграцию клеток в процессе развития эмбриона, передвижение фагоцитов к поврежденным тканям, ретракцию сгустка фибрина тромбоцитами, сокращение ворсинок щеточной каемки кишечного эпителия и т. д.

Двигательные реакции наблюдаются на разных уровнях биологической организации и практически у всех представителей живого. К таким явлениям относятся движения растений (открывание и закрывание цветов, движение листьев мимозы), бактерий и простейших в жидкой среде с помощью жгутиков и ресничек, многоклеточных организмов – гребневиков – посредством согласованной работы ресничек. Реснички создают ток жидкости в трахеях человека, жабрах двустворчатых моллюсков. При движении протоплазмы в клетке водоросли *Nitella* механическая сила создается на границе геля и золя, при этом наблюдается скольжение волокнистых структур относительно окружающего золя. При амебоидном движении в псевдоподиях происходит сборка и разборка микротрубочек. В амебах обнаружены пучки тонких нитей, выделены актино- и миозиноподобные белки. Плазмодий миксомицетов выполняет активные колебательные движения протоплазмы. Он также содержит актин и миозин, весьма сходные с мышечными.

Перемещение протоплазмы и хромосом при митозе и мейозе осуществляется митотическим аппаратом клетки, который состоит из видимых под микроскопом тяжей, соединяющих друг с другом центриоли и хромосомы с центриолями. Центриоли имеют структуру, подобную структуре жгутиков и ресничек. Более того, было показано, что жгутики сперматозоидов вырастают из центриолей и кинетохоров хромосом.

Чрезвычайно своеобразно строение локомоторного аппарата бактерии *Escherichia coli*. Оно напоминает колесо, которое признается гениальным творением человеческого разума. Каждая клетка *E.coli* имеет 4 жгутика, вращательные движения которых позволяют клетке перемещаться. В основании жгутика, расположенном на клеточной стенке и мембране, имеется «колесо» – кольцо из 16 молекул белков в мембране, противостоящее сходному кольцу в клеточной стенке (рис.17.1). Вращение жгутика в результате вращения кольца, подобного шарикоподшипнику, происходит за счет энергии, выделяющейся при переносе протонов внутрь клетки [1].

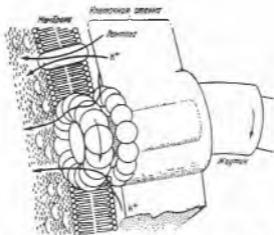


Рис. 17.1. Схема движущего устройства *E.coli* [1]

Рассмотренные примеры, а также работа мышц многоклеточных животных подтверждают справедливость принципа «единства во множестве», сформулированного основоположником биохимии мышечного сокращения В.А. Энгельгардтом. В основе функционирования большого числа разнообразных аппаратов движения лежит взаимодействие белков типа актина и миозина.

Как и в случае с ферментами, контракильные белки мышц в процессе работы не расходуются. Расходятся только соединения с макроэргическими связями, обеспечивающие энергией механохимический процесс.

17.2. Структура мышц и мышечных волокон

У высших организмов вся жизнедеятельность поддерживается механической работой внутренних органов (работой сердца, перистальтикой желудочно-кишечного тракта, дыхательными движениями), а также скелетными мышцами – для перемещения организмов в пространстве (ходьба, бег, полет, плавание). Механическая работа внутренних органов и скелетной мускулатуры у высших животных обусловлена возникновением у них особых высокоспециализированных сократительных клеток, имеющих в своем составе белки, обладающие сократительной способностью. Непроизвольные движения в организме позвоночных обеспечиваются сокращением сердечной и гладких мышц, а перемещение в пространстве – скелетными (произвольными) мышцами.

Мышцы – органы тела животных и человека, состоящие из мышечной ткани, которая способна сокращаться под влиянием нервных импульсов. Совокупность гладких, поперечнополосатых и сердечной мышц образует мышечную систему организма.

Поперечнополосатые (скелетные) мышцы состоят из продольных пучков волокон. Вся мышцу окружает тонкий чехол соединительной ткани – эпимизиум, от внутренней поверхности которого в глубь мышцы отходят тонкие разветвляющиеся перегородки, образующие перимизиум. Последний представляет собой оболочки отдельных пучков волокон. От слоя перимизиума, окружающего пучок волокон, внутрь отходят тончайшие прослойки соединительной ткани – эндомизиума, отделяющие друг от друга отдельные мышечные волокна. Мышечное волокно представляет собой сильно вытянутую многоядерную клетку и является основным морфологическим элементом мышцы. Толщина волокна лежит обычно в пределах от 10 до 100 мкм (в среднем - 50 мкм), длина может составлять от нескольких миллиметров до нескольких десятков сантиметров

В цитоплазме мышечной клетки (саркоплазме) от одного конца мышечного волокна до другого тянутся миофибриллы, с которыми связана способность мышцы к сокращению. Диаметр миофибрилл составляет 1-2 мкм, в одном мышечном волокне может насчитываться более 2000 миофибрилл, подразделяющихся на толстые (диаметр

10-12 нм, длина 1,5-1,7 мкм) и тонкие (диаметр 5-8 нм, длина – около 1 мкм) нити (микрофиламенты). У позвоночных животных вокруг одной толстой нити располагаются 6 тонких (гексагональная упаковка). Каждая миофибрилла имеет поперечную исчерченность, которая благодаря упорядоченному расположению миофибрилл видна и во всем мышечном волокне. При световой микроскопии в волокне выявляются темные (анизотропные) А-диски и светлые (изотропные) I-диски [3].

Миофибриллы разделены на саркомеры – отдельные отсеки, длина которых составляет в среднем 2,5 мкм. Между саркомерами находятся Z-линии (Z-мембраны), к которым крепятся актиновые (тонкие) нити. Эти линии, разделяющие саркомеры друг от друга, в быстрых мышцах обычно менее широкие (30-60 нм в поперечнике), чем в медленных (100-120 нм). В Z-линиях происходит связывание концевых частей актиновых филаментов, образующих тетрагональную укладку. При этом «4 пальца» филамента одного саркомера соединяются с «4 пальцами» филамента другого саркомера. Между ними находится матрикс, содержащий белок аморфин. Актиновые филаменты Z-линии удерживаются в правильном положении другими белками, в частности, α -актинином, молекула которого может связывать актиновые филаменты в параллельные пучки (рис. 17.2).

В линии Z обнаружены также белки цитоскелета, взаимодействующие с актинином. Белки Z-линии спектрин и ванкулин через анкирин связываются с интегральными белками мембраны. Таким образом, филаменты цитоскелета объединяют соседние миофибриллы друг с другом, удерживают саркомеры в определенных положениях, а также связывают Z-линии с СПР (саркоплазматическим ретикулом), T-системой и сарколеммой.

В центре саркомера расположены миозиновые (толстые) нити, скрепленные M-линией (M-мембраной). Соединение толстых филаментов с Z-линиями осуществляет титин – большой гибкий белок, расположенный параллельно толстым и тонким филаментам (рис.17.3).

В линии M, то есть в середине саркомера, отсутствуют головки миозиновых молекул. В ней белки образуют 5 поперечных сублиний, формирующих мостики, объединяющие толстые нити. Среди белков M-линии обнаружены изозим креатинкиназы (катализирующей образование АТФ за счет креатинфосфата), а также миомезин, который может сшивать миозиновые филаменты в гексагональную упаковку. Креатинкиназы и миомезина больше в белых (быстро сокращающих-

ся) и меньше в красных, богатых миоглобином (сокращающихся медленнее) мышцах.

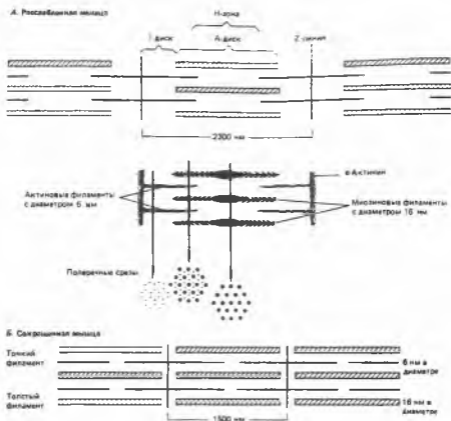


Рис. 17.2. Расположение филаментов в поперечнополосатой мышце: А - расслабленная мышца, Б - сокращенная мышца [4]

Саркомеры соседних миофибрилл имеют общий саркоплазматический ретикулум, а саркоплазматические ретикулумы двух последовательно расположенных саркомеров изолированы по Z-линии [3].

На уровне Z-мембран к каждому саркомеру спускаются поперечные Т-трубочки (Т-система), которые подходят близко к терминаль-

ным цистернам саркоплазматического ретикулула. СПР представлен терминальными цистернами (около Z-мембран) и продольными трубочками.

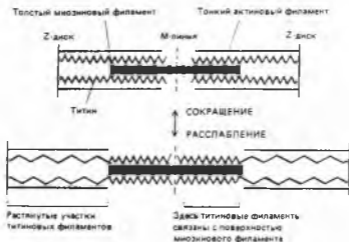


Рис 17.3. Сеть из нитей титина, которые, как предполагают, соединяют в саркомерах скелетных мышц толстые миозиновые филаменты с Z-дисками [5]

В момент генерации потенциала действия (ПД) происходит его распространение вдоль плазматической мембраны. Деполяризация мембраны передается на Т-трубочки, которые контактируют с терминальными цистернами СПР. В результате открываются кальциевые каналы и происходит выход ионов Ca^{2+} в цитозоль. Быстрое и резкое повышение (на 1-2 порядка) локальной концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле (от $5 \cdot 10^{-8}$ - $5 \cdot 10^{-7}$ М в покое до 10^{-6} - 10^{-5} М) ведет к инициации сокращения мышечной клетки.

Повышение концентрации внутриклеточного кальция в мышечных клетках при сокращении мышц может быть за счет высвобождения кальция из СПР, а также при его поступлении из внешней среды – по кальциевым каналам, неспецифическим катионным каналам, по механочувствительным каналам (открывающимся при растяжении клетки) и др. У скелетных и сердечных мышечных клеток для запуска сокращения главным источником прироста Ca^{2+} является СПР. Ионы Ca^{2+} слабо ассоциированы с Ca^{2+} -связывающим белком кальсеквест-

рином, который обладает низким сродством к Ca^{2+} , но высокой емкостью (до 50 ионов Ca^{2+} на одну молекулу белка).

Особым типом внутриклеточных хемоактивируемых кальциевых каналов, при открывании которых происходит быстрый выход кальция из СПР в миоплазму (по градиенту концентрации), являются рианодиновые рецепторы (РиР), имеющиеся только в составе мембран СПР.

В рианодиновых рецепторах имеются спеццентры для связывания ионов Ca^{2+} и АТФ. При действии на РиР ионов Ca^{2+} (в микромолярных концентрациях) и АТФ (в миллимолярных концентрациях) происходит открытие кальциевого канала в составе молекулы рианодинового рецептора. Открытие кальциевого канала в рианодиновом рецепторе также облегчается взаимодействием с данным рецептором кальмодулина [3].

В скелетных мышцах позвоночных СПР наиболее развит. Эти мышцы являются единственным типом мышечных элементов, которые не нуждаются в притоке Ca^{2+} снаружи (из-за пределов клетки) для развития сокращения. Поступление ионов Ca^{2+} из СПР в скелетных мышечных волокнах может полностью обеспечить повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} до уровня, необходимого для полноценного сокращения. В гладких мышцах, в связи со слабым развитием СПР, основное повышение уровня ионов Ca^{2+} , необходимое для запуска сокращения, происходит за счет его поступления через кальциевые каналы поверхностной мембраны. Сердечные мышечные волокна занимают в этом отношении, по-видимому, промежуточное положение [6].

Прекращение генерации потенциала действия ведет к усилению процессов откачивания ионов Ca^{2+} из миоплазмы в СПР и, как следствие, к снижению концентрации ионов Ca^{2+} до исходного уровня.

В мышечных клетках низкий уровень Ca^{2+} в цитоплазме поддерживают Ca^{2+} -зависимая АТФаза СПР мембраны клетки (Ca^{2+} -насос), осуществляющая перенос Ca^{2+} в наружную среду, и аналогичная ей по функции Ca^{2+} -АТФаза СПР, закачивающая в большом количестве Ca^{2+} внутрь цистерн СПР. Оба Ca^{2+} -насоса способны удалять ионы Ca^{2+} из саркоплазмы против градиента концентрации – за счет энергии АТФ.

В качестве дополнительного механизма понижения концентрации ионов Ca^{2+} внутри клетки может быть использован Na^+ - Ca^{2+} -транспортер, осуществляющий сопряженное выведение ионов Ca^{2+} из клетки с введением в клетку ионов Na^+ без непосредственного потребления энергии АТФ.

Снижение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле до исходного уровня, характерного для состояния покоя, вызывает расслабление мышцы. Явление сопряжения процессов повышения концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле (вследствие их выхода из СПР при распространении потенциала действия) с инициацией сокращения мышцы и последующего откачивания ионов Ca^{2+} из цитозоля в СПР, сопровождающегося расслаблением мышцы, получило название электромеханическое сопряжение или электромеханический каплинг [7].

Именно электромеханическое сопряжение обуславливает в мышцах превращение химической энергии в механическую энергию мышечного сокращения.

Сокращение мышц происходит за счет взаимодействия сократительных белков – миозина и актина.

Миозин состоит из двух тяжелых параллельных α -спиральных полипептидных цепей, которые с С-конца (хвостовая часть) закручиваются относительно друг друга в суперспираль, стабилизированную за счет взаимодействий и электростатических контактов соседних цепей. N-концевая часть каждой из тяжелых цепей формирует глобулярную головку с АТФазным и актинсвязывающим центрами. В области «шейки» молекулы миозина расположены (удерживаемые за счет нековалентных взаимодействий) 4 легкие цепи (2 щелочные и 2 регуляторные), участвующие совместно с тяжелыми цепями в образовании прочного комплекса – мономерного миозина (рис.17.4).



Рис. 17.4. Схема молекулы миозина с двумя переплетенными α -спиралями (фибриллярная часть), глобулярной областью (G) и легкими цепями (L) ([4])

Путем ферментативного гидролиза молекулы миозина получены легкий меромиозин (ЛММ) и тяжелый меромиозин (ТММ), включающий в себя S-1-фрагмент (головку) и S-2-фрагмент (стержень). Участки молекулы миозина между S-1- и S-2-фрагментами, а также между ЛММ и ТММ обладают подвижностью (рис.17.5).

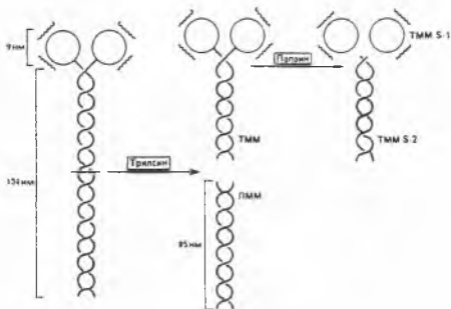


Рис. 17.5. Ферментативное расщепление миозина: ТММ – тяжелый меромиозин, ЛММ – легкий меромиозин, S-1 – фрагмент 1, S-2 – фрагмент 2 [4]

АТФ-связывающий центр головной части миозина пространственно удален от актинсвязывающего центра. АТФ проникает в щель, сформированную разными по структуре участками полипептидной цепи, а актинсвязывающий центр формируется (в другом участке цепи) двумя частями, рассеченными глубокой щелью.

Второй сократительный белок – актин – активирует катализируемый миозином гидролиз АТФ. Актин существует в виде глобулярного мономера (G-актин) и фибриллярного (F-актин) нековалентного линейного полимера молекул G-актина (рис.17.6).

В G-актине различают большой и малый домены, отделенные друг от друга глубокой щелью. В этой щели расположены центры

связывания нуклеотидов (АТФ и АДФ) и двухвалентных ионов (Ca^{2+} и Mg^{2+}). Полимеризацию G-актина (с образованием двухтяжевой правой спирали с шагом в 72 нм) вызывает добавление к его раствору солей одно- или двухвалентных катионов. Соседние тяжи мономеров актина связаны между собой своеобразной шпилькой (из 4 гидрофобных остатков аминокислот), расположенной в одном тяже и вклинивающейся в гидрофобный карман соседнего тяжа [3].

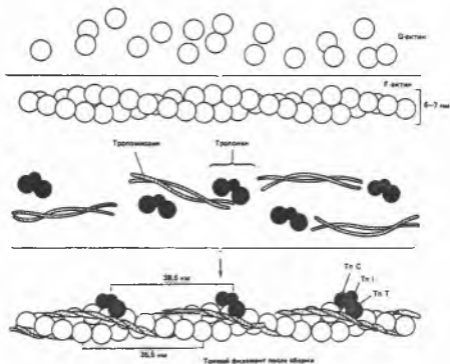


Рис.17.6. Схематическое изображение тонкого миофиламента [4]

Нити актина полярны, так как на их концах в сторону растворителя обращены домены, различающиеся по структуре и свойствам. В присутствии головок миозина нити актина образуют так называемые стреловидные структуры с острым и тупым концами. Нить актина постоянно подвергается полимеризации и деполимеризации. На остром («заостренном») конце скорость полимеризации меньше скорости деполимеризации, а на тупом («оперенном») конце, наоборот, скорость полимеризации намного больше скорости деполимеризации.

Следовательно, новые мономеры актина (как правило, содержащие в своем составе АТФ) присоединяются преимущественно к тупому концу, а старые (содержащие АДФ) – диссоциируют на остром. Мономеры актина как бы путешествуют по нити – вначале они прикрепляются к ее тупому концу, потом (по мере присоединения новых мономеров) перемещаются в центр нити, а в ходе деполимеризации отделяются от заостренного конца нити. Описанные процессы полимеризации и деполимеризации играют существенную роль в немышечных сократительных процессах (образование отростков у кровяных пластинок, микроворсинок у клеток и др.).

Вдоль нити актина прикрепляется белок тропомиозин – димер из одинаковых или очень похожих друг на друга мономеров. Первичная структура тропомиозина имеет много общего с таковой хвостовой частью миозина, формируя, как и миозин, почти идеальную α -спираль. Две полипептидные цепи тропомиозина закручиваются относительно друг друга, образуя стабильную суперспираль, способную вступать в контакт как с соседними димерами тропомиозина, так и с актином. Молекулы тропомиозина уложены в канавки спирали актина на всем ее протяжении.

В поперечнополосатых мышцах ориентация тропомиозина внутри канавки актина определяется тропониновым комплексом, в состав которого входят три регуляторных белка: тропонин С (ТпС – Ca^{2+} -связывающий), тропонин I (ТпI – ингибирующий) и тропонин Т (ТпТ – тропомиозинсвязывающий). Этот тропониновый комплекс располагается на тропомиозине с периодичностью в 7 мономеров актина и (совместно с тропомиозином) участвует в регуляции сократительной функции мышц (скелетной и сердечной). Белки актин, тропомиозин и тропониновый комплекс являются основными компонентами тонких актиновых филаментов миофибрилл.

В покоящейся мышце тропонин С и тропонин I создают условия для того, чтобы находящаяся на актиновой нити фибриллярная молекула тропомиозина блокировала место сязывания миозина с актином и тем самым препятствовала миозиновой головке контактировать с актином. Именно связывание ТпI с актином в покое ведет к перемещению тропомиозина на актиновом филаменте к месту контакта головки миозина с актином, а следовательно, и к ингибированию взаимодействия миозина с актином и АТФазной активности актомиозина.

Инициация сокращения мышцы происходит при вхождении ионов Ca^{2+} в цитозоль. Ионы Ca^{2+} , присоединяясь к ТпС (имеющему 4 катионсвязывающих центра), обуславливают изменение структуры ТпС и

TnI, ведущее к отщеплению TnI от актина и некоторому изменению положения TnT и тропомиозина на актине. В результате этого освобождается участок взаимодействия головок миозина с актином и к актиновой нити прикрепляется мостик (головка миозина – S-1 и стержень – S-2). Взаимодействие актина с миозином активирует АТФазную активность миозина и, как следствие, ускоряет гидролиз АТФ.

17.3. Механизм мышечного сокращения

Мышечное сокращение происходит в условиях постоянной температуры и давления, то есть оно совершается не за счет тепловой энергии. В.А. Энгельгардт и М.Н. Любимова впервые показали, что основной белок мышцы актомиозин способен сокращаться, производя механическую работу, при добавлении универсального переносчика химической энергии в биосистемах – АТФ.

Таким образом, было установлено, что мышечное сокращение – механохимический процесс. Он заключается в прямом преобразовании химической энергии в механическую с коэффициентом полезного действия приблизительно 70% (до 75%).

Этот механохимический акт протекает на молекулярном уровне и, по мнению С.Е. Бреслера, должен являться объектом изучения молекулярной биологии [8]. Он, как и рассмотренные ранее каталитические процессы, связан с изменением конформации белков. Однако механохимические проявления в мышцах значительно более выражены, прежде всего благодаря тому, что они осуществляются кооперативно, на макроуровне, с участием специальных надмолекулярных структур. В связи с этим известный отечественный биофизик В.И. Дещеревский писал: "Мышечные белки – это единственные представители настоящих ферментов, в которых имеют место такие механические изменения при их взаимодействии с субстратом (АТФ), для обнаружения которых не требуется сложных приборов, настолько они явны, как на уровне целой мышцы (...), так и на уровне белковых препаратов, выделенных из мышц: невооруженным глазом видно, как сжимается и уплотняется актомиозин при добавлении АТФ.

Мышечные белки являются, по-видимому, вершиной эволюции механизма биологического катализа, в них он выступает в наиболее яркой форме, и поэтому естественно ожидать, что основные принципы действия этого механизма удобно изучать именно на их примере" [9].

Проблема мышечной функции вызвала к жизни новую пограничную область знания, которую В.А. Энгельгардт назвал «механохими-

ей» [10]. Энергией мышечное сокращение обеспечивают молекулы АТФ. При нормальной работе мышца покрывает свои энергетические расходы за счет аэробного механизма, при котором АТФ образуется в многочисленных митохондриях мышечной клетки. При высокой мышечной нагрузке к выработке АТФ подключается анаэробный метаболизм (гликолиз). Кроме того, АТФ образуется в реакции Ломанна



катализируемой креатинкиназой, и в реакции



катализируемой миокиназой [11].

Наибольшие трудности возникали при раскрытии молекулярного механизма превращения химической энергии АТФ в механическую работу мышц. Было предложено много моделей (полиэлектrolитная модель Хилла и Мейергофа; модель Сцент-Дьердьи, основанная на квантовой миграции энергии по квазикристаллической сетке воды, окружающей миозин; модель Мак-Клэйра, предполагавшая резонансный перенос «молекулярной энергии» в мышце; модель Давыдова, согласно которой перенос энергии происходит путем распространения солитона – одиночной, не диссипирующей волны колебательного возбуждения С=О-связей в α -спиралях миозина и др.) [1]. Наибольший интерес представляет ряд различных моделей, основанных на гипотезе скользящих нитей. Большинство исследователей придерживается мостиковой теории генерации силы, возникающей при конформационной перестройке актомиозиновых комплексов, периодически возникающих и распадающихся между толстыми и тонкими нитями. Решающим доводом в пользу мостиковых моделей являются опыты Гордона, Хаксли и Джулиана (1966), получивших зависимость изометрической силы мышечного волокна от его длины (и длины саркомера). Эта зависимость (рис.17.7) находит логическое объяснение с позиции мостиковой гипотезы.

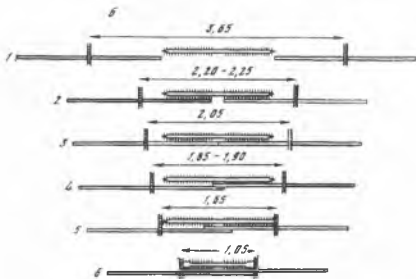
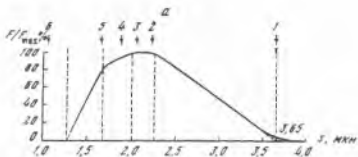


Рис. 17.7. Зависимость изометрического напряжения мышечного волокна (а) от степени перекрытия нитей (б) [9]

Открытие образования мостиков между миозиновыми и актиновыми филаментами, активации при этом АТФазной активности миозина, изменений, происходящих в головке миозина и в строении нуклеотида (в процессе гидролиза АТФ), а также возможности перехода мостиков из одного состояния в другое под воздействием измененного нуклеотида обусловило значительный прогресс в изучении молекулярных механизмов мышечного сокращения.

Современная, хотя все еще предполагаемая модель сокращения мышцы предусматривает, что именно конформационные изменения в головке миозина при гидролизе АТФ лежат в основе молекулярного механизма сокращения [3].

Первоначально при взаимодействии актина и миозина (после снятия ингибирующего влияния на актин тропонинового комплекса) головка миозина прикрепляется к актиновой нити под углом 90° .

Свободная головка миозина (до прикрепления к актину) может связываться с АТФ и гидролизовать его до АДФ и фосфата, но не обеспечивает освобождение продуктов гидролиза. Этот процесс обратим, так как энергия гидролиза АТФ первоначально запасается в напряженной конформации белка, с которым связаны АДФ и неорганический фосфат [5]. Оставаясь нековалентно связанными с молекулой миозина, АДФ и фосфат препятствуют присоединению и последующему гидролизу новых молекул АТФ.

Инициация АТФазной активности миозина при взаимодействии миозина с актином ускоряет как гидролиз АТФ, так и высвобождение АДФ и фосфата из актинмиозинового комплекса. Без актина гидролиз одной молекулы АТФ за счет АТФазной активности одной молекулы миозина происходит примерно за 0,5 мин, в присутствии актиновых филаментов каждая молекула миозина начинает гидролизовать от 5 до 10 молекул АТФ в секунду (то есть в 150-300 раз быстрее, чем без актина).

Поскольку актинмиозиновая связь наименьшую энергию имеет при величине угла 45° , то при перпендикулярном расположении головки миозина по отношению к оси фибриллы (то есть при угле 90°) возникает напряжение, стремящееся уменьшить угол между головкой и хвостом миозина до 45° , в результате чего происходит наклон головки миозина в направлении центра саркомера со смещением актиновой нити в этом же направлении [16]. При этом головка миозина остается связанной с актином, а хвостовая часть закрепленной в миозиновом филаменте, что создает тянущее усилие и проталкивание нити актина на один шаг относительно нити миозина (рис. 17.8).

Быстрое отделение АДФ и фосфата от молекулы миозина (при связывании миозина с актином) создает возможность присоединения к молекуле миозина новых молекул АТФ и возобновления цикла. При присоединении новой молекулы АТФ к комплексу миозин-*F*-актин происходит отделение миозиновой головки (с присоединенным к ней АТФ) от *F*-актина вследствие низкого сродства АТФ к актину. Эта стадия и есть собственно расслабление мышцы. Таким образом, АТФ отсоединяет миозиновую головку от актина и является движущей си-

лой сокращения мышцы [4]. В дальнейшем при каждом повторении цикла нить актина проталкивается еще на один шаг относительно нити миозина.

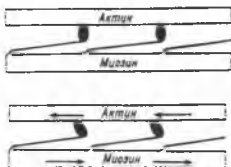


Рис. 17.8. Модель, иллюстрирующая возникновение сил механической тяги благодаря взаимодействию волокон миозина и актина [8]

Скольжение актиновых нитей в промежутках между миозиновыми, обуславливающее сокращение мышцы, осуществляется поперечными мостиками (головками миозина – S-1-фрагментами), соединенными стержнями (S-2-фрагментами) с телом (хвостом) миозиновой нити. Каждая молекула актина в составе актинового филамента способна связать одну миозиновую головку. Чем больше мостиков будет сформировано между нитями актина и миозина, тем большую силу будет развивать мышца. Число способных к работе поперечных мостиков будет зависеть от протяженности перекрытия толстых и тонких филаментов, то есть от длины саркомера [3].

Длина нитей актина и миозина в ходе сокращения не меняется. Изменение длины саркомера при сокращении происходит в результате относительного смещения толстых и тонких нитей.

Все головки миозина способны присоединяться к комплементарным центрам актина на тонких нитях, но одновременного замыкания всех мостиков при сокращении не происходит. Замкнувшиеся мостики подвергаются определенному структурному переходу, при котором они развивают усилие, после чего происходит их отсоединение (размыкание). Сокращение и расслабление мышцы состоит в нарастании и последующем уменьшении числа мостиков, совершающих циклическую активность. Каждый такой цикл (замыкание – размыкание мостика) связан с гидролизом одной молекулы АТФ. Мышечное со-

кращение обусловлено только силами, развиваемыми мостиками, – никакие другие силы не вносят заметного вклада в сократительный процесс [2].

При мышечном сокращении АТФаза преобразует в механическую работу энергию катализируемой ею реакции гидролиза АТФ. Миозиновые мостики, взаимодействующие с актиновой нитью, представляют собой одновременно работающее множество элементарных механохимических преобразователей энергии, рабочим ходом которых является цикл работы мостика (его замыкание, размыкание, совершение работы – вызывая движение нитей), в процессе которого происходит превращение химической энергии АТФ в механическую энергию мышечного сокращения [13].

Л. Страйер (1985) рабочим ходом сокращения актомиозина называет поворот связанной с актином головки миозина (S-1); генерирование силы сокращения связывает с циклическим образованием и диссоциацией комплекса головки миозина с актином; считает, что в генерировании силы сокращения важная роль принадлежит шарнирным соединениям в молекуле миозина (между головкой – S-1 и стержнем – S-2, а также между S-2 и ЛММ).

Благодаря шарнирам – гибким участкам полипептидной цепи (подобным шарнирам иммуноглобулинов) – обеспечивается сегментарная подвижность молекулы миозина, в частности, обратимое присоединение головки к актину или отсоединение от него, а также возможность менять направление своего движения – находясь в связанном состоянии с актином.

При сокращении мышцы подтягивание друг друга толстыми и тонкими филаментами с помощью мостиков, работающих циклично, иногда сравнивают с миниатюрными веслами [5], с «гребками», в результате которых мостик проталкивает актиновую нить (одним «гребком») примерно на 10 нм [7]. Каждый толстый филамент содержит около 500 миозиновых головок, и каждая из них при быстром сокращении совершает около пяти шагов-циклов в секунду [5].

Таким образом, сокращение поперечнополосатых мышц происходит в результате АТФ-зависимого циклического взаимодействия головок миозина с актиновыми нитями (присоединение к актину и отделение от него головок миозина), сопровождаемого конформационными изменениями актомиозинового комплекса и скольжением актиновых филаментов вдоль миозиновых. Эффективной работе этого цикла способствуют специальные вспомогательные белки, которые поддерживают пространственную организацию актиновых и миозиновых филаментов.

17.4. Регуляция мышечного сокращения

Регуляция и управление мышечной деятельностью осуществляется как на физиологическом, так и непосредственно – на биохимическом (молекулярном) уровнях. Регулируемыми параметрами являются скорость сокращения, мышечное усилие и величина укорочения мышцы. Среди высокомолекулярных агентов, участвующих в регуляции мышечной деятельности, следует назвать ионы кальция и регуляторные белки (тропонин, тропомиозин, кальдесмон и др.).

Генерация потенциала действия обуславливает высвобождение ионов Ca^{2+} из СПР и повышение концентрации кальция в цитозоле мышечных клеток. Повышение в цитозоле концентрации кальция ведет к конформационным изменениям регуляторных белков – тропонина и тропомиозина в составе актиновых филаментов (актиновый тип регуляции) и инициирует взаимодействие актина и миозина, сопровождающееся сокращением мышц, с последующим их расслаблением.

Актин, миозин, тропомиозин присутствуют во всех мышцах, тропонин – только в поперечнополосатых. В гладких мышцах, в которых тропонин отсутствует, сокращение происходит по тому же принципу, что и в поперечнополосатых, но элементарные сократительные блоки в гладкомышечных клетках мельче и обладают менее высокой степенью упорядоченности. Однако сокращение гладких мышц также регулируется ионами Ca^{2+} . В них имеют место Ca^{2+} -зависимые как актиновый, так и миозиновый типы регуляции

Миозин гладких мышц содержит легкую цепь, предотвращающую связывание миозиновых головок с F-актином. Фосфорилирование легкой цепи миозина Ca^{2+} -зависимой киназой, присутствующей в саркоплазме гладких мышц, прекращает ингибирование этой цепью взаимодействия миозина с F-актином и инициирует начало сократительного цикла (миозиновый тип регуляции). Киназа легких цепей миозина активируется путем ее связывания с кальмодулином, содержащим четыре Ca^{2+} .

На тонких филаментах гладких мышц располагаются белки кальдесмон и кальпонин, причем кальдесмон (в гладких мышцах) и тропонин (в поперечнополосатых) занимают практически одинаковое положение на нити F-актина и различаются лишь характером связывания тропомиозина. Предполагают, что механизм функционирования кальдесмона во многом аналогичен механизму функционирования тропонинового комплекса (актиновый тип регуляции), но общепризнанной модели такого функционирования кальдесмона нет [3].

Миозиновый тип регуляции сокращения играет главную роль в мышцах моллюсков, а также в гладких мышцах высших животных и в ряде клеток, обладающих немышечной активностью. В поперечнополосатых мышцах миозиновый тип регуляции (фосфорилирование легких цепей миозина) может участвовать в тонкой подстройке (модуляции) сокращения.

Актиновый тип регуляции является основным в инициации сокращения скелетных и сердечной мышц, а в гладких играет вспомогательную роль, обеспечивая модуляцию взаимодействия миозина с актином [3].

Сократительный аппарат мышечных и немышечных клеток точно настроен на выполнение специфических функций в зависимости от типа клеток. Это определяется тканеспецифической экспрессией различных генов, кодирующих мышечные белки, и тканеспецифической же регуляцией сплайсинга мРНК, благодаря которым один ген может давать слегка различающиеся варианты белков. Например, ген тропонина Т (ТnТ) дает по меньшей мере 10 различных форм белка, по-разному взаимодействующих с тропонином С (ТnС) и тропомиозином. Это возможно в связи с тем, что тканеспецифическая регуляция сплайсинга пре-мРНК позволяет комбинировать различные наборы экзонов. Характер сплайсинга пре-мРНК может изменяться под действием гормональных, нервных и других биорегуляторных факторов, и в результате возможно изменение последовательности аминокислот определенных мышечных белков в зависимости от ткани и стадии онтогенеза [5].

Особый интерес представляет регуляция работы летательных мышц насекомых, частота сокращения которых в сотни раз превосходит частоту поступления в них нервных импульсов. Так, у мухи частота потенциала, подаваемого на летательные мышцы, равна 3 Гц, а частота колебаний крыльев достигает 120 Гц. По-видимому, здесь имеет место автоколебательный процесс [14], который может быть воспроизведен на скелетной мышце позвоночных. Так, В.И. Децеровский на основании своей модели работы поперечнополосатой мышцы подобрал такие условия, при которых изолированная мышца кролика стала вести себя как летательная мышца насекомого – в автоколебательном режиме [15].

РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ ИЗБРАННЫЕ ГЛАВЫ ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ

Особенности эволюции биосистем в период их становления

Слово «эволюция» в широком смысле обозначает изменение состояния *любой* системы в течение более или менее длительного времени. Можно говорить об эволюции Вселенной, галактик, звезд, планет. Каждое из этих небесных тел, образующих гигантскую иерархическую систему, имеет свое время возникновения, свою длительность существования, эволюцию с присущими ей закономерностями, движущими силами и результатами их действия.

Наша планета является единственным небесным телом, несущим на своей поверхности живые организмы, которые человек – разумный представитель этих организмов – имеет возможность изучать.

Длительное существование небесных тел связано с циклическим характером их движения вокруг своих центров притяжения. Однако, поскольку небесные тела, например Земля, одновременно участвуют в нескольких циклических движениях с возрастающей на порядки длительностью при переходе к более высокому иерархическому уровню, то после каждого малого цикла (по прошествии суток) любая точка ее поверхности окажется в несколько отличающихся условиях. Благодаря этому создается определенная общая направленность циклического процесса и условий протекания химических реакций на планете. Помимо этого, следует учитывать и ряд других факторов, имеющих определенную направленность, источник которых находится на самом небесном теле (процессы, протекающие внутри планеты) или вне его (например, на Солнце).

В таких изменяющихся условиях происходила эволюция неживой материи на нашей планете. Земля, подобно гигантскому тепловому насосу, поглощала падающий на нее солнечный свет, при своем вращении «перекачивала» полученное тепло на теневую сторону и излучала его в космическое пространство. Благодаря этому возникали воздушные потоки, которые переносили массы испарившейся воды из одного места в другое, создавая ее круговорот. Ручьи и реки –

участники этого круговорота – размывали горные породы, изменяли рельеф планеты. Химические реакции носили преимущественно односторонний характер, образуя устойчивые химические соединения, обычно окислы. В отсутствие атмосферного кислорода интенсивное ультрафиолетовое излучение Солнца вызывало фотохимические реакции. Многократная воспроизводимость химических реакций и определенная их направленность обеспечивались повторяемостью внешних условий, относительным химическим однообразием участников реакции и высокой стабильностью образующихся продуктов. Сопровождающие эволюцию неживой материи процессы могут быть объяснены с позиции известных законов физики и химии. В ходе эволюции неживой природы создались предпосылки и условия для возникновения живых систем.

Биологическая эволюция представляет собой необратимый процесс исторического изменения живой природы. Она, естественно, включает протекание как физических, так и химических процессов, но осуществляющихся в иных условиях под контролем специфических биологических законов, основывающихся на «трех китах» дарвиновской теории – изменчивости, наследственности и естественном отборе.

Поскольку начальный этап биологической эволюции протекал на молекулярном уровне, то изменчивость связана с лабильностью формирующихся биомолекул. Современные биомолекулы представляют собой самые простые биологические системы. Фермент, например, отвечает всем критериям систем: представляет собой совокупность взаимосвязанных элементов (прежде всего, аминокислотных остатков в первичной структуре белковой молекулы), имеет структурную организацию (даже иерархию структур – от первичной до четвертичной), обладает управляемостью (в частности – через аллостерический центр). Принадлежность ферментов к биологическим системам обусловлена их биологической функцией и локализацией в биосистеме более высокого уровня, детерминированностью структуры в геноме, биологическим происхождением (синтезируется в клетке) и историческим прошлым (является продуктом биологической эволюции). Нечто подобное можно сказать и о нуклеиновых кислотах.

Формирующиеся на начальных этапах биологической эволюции катализаторы еще не успели приобрести тех качеств, которые имеются в «послужном списке» современных ферментов.

Случайное соединение аминокислотных остатков дает бесчисленное множество различающихся между собой полипептидов. Химические реакции их образования конкурируют между собой за субстрат

(аминокислоты). И если среди этих полипептидов случайно образуется фермент, способный многократно ускорять неизбирательный процесс их образования, причина для естественного отбора этого фермента не появится и он подвергнется параллельно идущему гидролизу, не оставив «преемника». Полипептиды самостоятельно не могут обеспечить самовоспроизведение.

Полинуклеотиды также образуются путем случайного сочетания мононуклеотидов. Они способны к самовоспроизведению с использованием матричного синтеза и при образовании за свои строительные блоки конкурируют «на равных», хотя может проявляться некоторая селекция, обусловленная их неодинаковой стабильностью.

Случайно возникший среди полипептидов фермент репликазы, способный многократно ускорять процесс комплементарного синтеза полинуклеотидов, тоже не создает весомой причины для включения в работу естественного отбора. Не поможет этому и сосредоточение синтезирующихся полинуклеотидов и репликазы в одном коацервате.

Необходимо симбиотическое объединение в небольшом объеме молекул белков-ферментов, способных, как минимум, неизбирательно ускорять процесс репликации, с полинуклеотидами и молекулярным механизмом трансляции, под которой понимается биосинтез белков с последовательностью линейного расположения аминокислотных остатков в цепи, строго соответствующей последовательности нуклеотидов в нуклеиновой кислоте. Коацерваты, в которых окажутся молекулы полинуклеотида, несущие информацию о первичной структуре репликазы, и механизм трансляции, будут быстрее расти, чаще делиться и вытеснять коацерваты с полинуклеотидами, реплицирующимися без участия фермента репликазы. Среди коацерватов будет происходить естественный отбор.

Изменчивость полипептидов стала происходить преимущественно за счет мутации полинуклеотидов. Благодаря ей и естественному отбору будущие клетки приобретают белковые молекулы с новыми полезными свойствами, то есть проходят процесс биологической эволюции.

Таким образом, переход от эволюции неживой природы к биологической эволюции на начальной стадии формирования живых систем обусловлен появлением механизмов репликации и трансляции, а также катализаторов белковой природы (ферментов).

Ферментативные реакции в силу очень высокой скорости протекания и специфичности действия получают превосходство при конкуренции за субстраты с неферментативными реакциями и позволяют направлять биохимические процессы по определенному, эволюционно

выгодному пути. Положительные обратные связи, существующие между репликацией и трансляцией, могут вызвать автокаталитический процесс самовоспроизводства более приспособленных биологических систем и быстрого вытеснения ими менее приспособленных.

Поскольку образование многих биомолекул обычно идет с затратой энергии, уже на ранних стадиях эволюции живого получили широкое распространение сопряженные реакции. Одна из них образует макроэргические соединения, запас свободной энергии которых используется в другой реакции при синтезе биомолекул.

Характерным для эволюции биологических систем является блочный механизм их усложнения, что проявилось и на молекулярном уровне. В частности, в случае с эволюцией нуклеиновых кислот вначале образовались абиогенным путем отдельные нуклеотиды. Затем их объединение в сравнительно короткие цепочки (олигонуклеотиды) дало первые наследственные молекулы, кодирующие первичную структуру отдельных полипептидов, например ферментов. По мере усложнения метаболизма пробионтов возник набор таких олигонуклеотидов (генов), которые объединились в одну полинуклеотидную цепь – хромосому. В отличие от бактерий, имеющих одну хромосому (кольцевую), более сложно устроенные эукариотические клетки содержат уже целый набор разных хромосом, которые в совокупности образуют геном. В мейозе хромосомы ведут себя как отдельные блоки, случайным образом распределяясь по гаметам. Таким образом, в процессе эволюции происходило непрерывное формирование из простейших блоков – нуклеотидов, все более сложных блоков – генов, хромосом, генотипов.

Несмотря на наличие чрезвычайно существенных особенностей, биологическая эволюция не может рассматриваться в отрыве от эволюции неживой природы. Динамичное изменение условий на Земле в ранний период формирования живого направило биологическую эволюцию по определенному руслу, а значительно позднее, когда деятельность биосферы приобрела планетарные масштабы, обе эти эволюции стали «на равных», во взаимодействии формировать лик нашей планеты.

Основополагающие молекулярные механизмы, как правило, формировались на ранних стадиях эволюции и затем нередко сохранялись практически в неизменном виде. Отсутствие промежуточных форм таких механизмов у современных организмов создает чрезвычайно большие сложности при попытках мысленно воссоздать их, как, например, в случае с возникновением функциональной связи между полинуклеотидами и полипептидами, проявляющейся в на-

стоящее время в законченной форме сложного процесса трансляции. Тем не менее сравнительный подход, оправдавший себя при изучении эволюции многоклеточных организмов (в зоологии, ботанике, физиологии), позволяет успешно проследить пути эволюционного процесса и на молекулярном уровне.

В настоящем разделе кратко рассмотрены сценарии возникновения жизни на Земле и эволюции живого на молекулярном уровне с использованием сравнительно-биохимического подхода.

ГЛАВА ВОСЕМНАДЦАТАЯ ВОЗНИКНОВЕНИЕ ЖИЗНИ НА ЗЕМЛЕ: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АСПЕКТ

18.1. История вопроса

Подробно история вопроса о проблеме возникновения жизни на Земле изложена в монографиях академика А.И. Опарина [1, 2]. В настоящем разделе дается лишь краткая историческая справка об эволюции воззрений людей по проблеме происхождения жизни.

Вопрос о происхождении всего живого на Земле, включая человека, возник, по-видимому, вместе с появлением первого представителя вида *Homo Sapiens*. Научный ответ на этот вопрос принципиально отличается от религиозных представлений о сотворении мира.

Известная способность животных и растений естественным путем производить потомство не давала ответа на вопрос о первичном появлении живых организмов на Земле. Предлагались различные попытки ответить на него, наиболее распространенные из которых основывались на принципе самозарождения жизни. До сравнительно недавнего времени существовало сложившееся еще у древних народов представление о самозарождении живых существ из неживого материала под влиянием различных воздействий. Так, начиная с середины первого тысячелетия до н. э. в работах большинства философов древней Греции вполне определенно высказывалось положение о том, что все организмы могут возникать из таких материалов, как земля, вода, песок, ил, тина, всякого рода гниющие отходы, грязь, навоз и т. д. Среди внешних воздействий, «оживляющих» эти материалы, назывались: солнечное тепло, некие атомы огня, попадающие в землю из воздуха с дождевой водой «эфирные зародыши», получающие жизнь от небесного огня. Аристотель считал, что живые существа образуются путем соединения пассивного начала (по-видимому, материала) с активным началом – душой («энтелехией

тела»). Учение о самозарождении, развитое в работах Аристотеля и римских философов, поддержанное авторитетом христианской церкви, оказало такое влияние на сознание людей, что представление о возникновении гусей из плодов неких гусиных деревьев просуществовало до начала XVII века. Под натиском добытых наукой неоспоримых фактов теории самозарождения жизни были вытеснены вначале из зоологии и ботаники, затем из микробиологии и вирусологии. Тщательно выполненными экспериментами было показано, что не только животные и растения, но даже такие простые по строению организмы, как бактерии и вирусы, не способны спонтанно возникать из материала неживой природы.

Близки к рассмотренным представлениям теории вечности жизни, согласно которым последняя является неотъемлемым свойством всякой материи, она так же стара, как и материя, и никогда не возникала. Так, немецкий философ (он же – математик, физик, языковед) Г. Лейбниц (1646-1716) развил учение о вечно существующих, всюду рассеянных зародышах жизни, из которых путем последовательного развития образуются все живые существа. Однако за понятием «зародыши жизни» и многими другими родственными по смыслу терминами не стоит никакое конкретное содержание. И что это за субстанция, которая сохраняет способность создавать живые существа после пребывания в жестких физических условиях формирования нашей планеты?

О зародышах жизни как о чем-то реальном можно вести речь, понимая под ними материальные носители жизни, например, споры микроорганизмов, попавшие на Землю из космоса после сформирования на ней условий, в которых эти споры могли бы перейти из анабиотического состояния в активное. Эта мысль была сформулирована шведским физико-химиком С. Аррениусом (1859-1927) в виде теории панспермии. Однако детальный анализ теории С. Аррениуса показал невозможность сохранения жизнеспособности спор после длительного пребывания их в космическом пространстве в условиях жесткого ультрафиолетового излучения.

Христианская религия предлагает свою модель сотворения жизни на Земле, но религия и Бог, если под ним понимать персонифицированный, «очеловеченный» Высший Разум (высокоразвитую внеземную цивилизацию), не одно и то же. С учетом провозглашенной еще Д. Бруно (1548-1600) концепции о бесконечности и бесчисленном множестве миров Вселенной, можно допустить, что жизнь на Землю была «умышленно» занесена («интродуцирована») представителями какой-то высокоразвитой внеземной цивилизации. Это могло бы

быть осуществлено или с помощью космических аппаратов или путем трансляции на Землю электромагнитного излучения (ЭМИ), несущего особым образом закодированную генетическую информацию о строении биологических систем, то есть посредством направленного дистантного (на расстоянии) синтеза в древнем Мировом океане молекулярных носителей генетической информации (например, молекул ДНК) из исходных блоков (нуклеотидов), способных по резонансному механизму избирательно воспринимать ЭМИ определенных длин волн. Принципиальную возможность такого механизма, невосприимчивого к губительному действию ультрафиолетового излучения, исключить нельзя, если учесть, что подавляющую часть информации об окружающем мире человек получает через орган зрения с участием ЭМИ видимого диапазона, а в повседневной жизни использует ЭМИ радиочастотного диапазона для передачи информации (радио, телевидение) и управления различного рода устройствами, включая удаленные от него на громадные расстояния космические аппараты (радиуправление). К тому же наиболее важные биомолекулы (нуклеиновые кислоты, белки и др.) содержат бензольные кольца и гетероциклы, которые способны избирательно поглощать по резонансному механизму ЭМИ радиочастотного диапазона и реагировать на них [4]. Ароматические (бензоидные и гетероциклические) соединения в предполагаемый период возникновения жизни на Земле абиогенным путем образовались и имелись в водах Мирового океана. В таком аспекте библейская модель сотворения жизни на Земле внешне напоминает гипотетическую модель сотворения ее с участием некой высокоразвитой внеземной цивилизации в тот период развития нашей планеты, когда на ней создались физические и химические условия для заселения биологическими системами.

Следует заметить, что получившие признание модели возникновения жизни на Земле, о которых пойдет речь ниже, с позиции теории вероятностей не более достоверны, чем модели с «заносом» биологических систем внеземной цивилизацией. Однако последние «оставляют за кадром» механизм первоначального превращения неживой материи в живую, которое произошло на каком-то космическом теле. Достоинством современных теорий возникновения жизни является то обстоятельство, что их авторы из Космоса «спустились на Землю» и рассматривают проблему исходя из предположения, что превращение неживого вещества в биологические системы произошло на нашей планете.

18.2. Живая материя и ее критерии

Интуитивно легко осуществляемое разделение объектов окружающего мира на живое и неживое при строгом подходе к этому вопросу оказалось далеко непростым делом. Критерии, используемые для характеристики живого, при более широкой их трактовке нередко оказываются применимыми и к неживым объектам. Это косвенно говорит в пользу происхождения живого из материала неживой природы.

Для проблемы возникновения жизни на Земле понятия живого и жизни являются ключевыми. В современной трактовке под жизнью понимается одна из форм существования материи, закономерно возникающая при определенных условиях в процессе ее развития, причем ничего не оговаривается о конкретном месте ее возникновения. Способностью жить наделены организмы, которые от неживых объектов отличаются наличием обмена веществ, раздражимости, способности к размножению, росту, развитию, активной регуляции своего состава и функций, различным формам движения, приспособляемости к среде и т.д. Еще более определенно о жизни говорит Ф. Энгельс: "Жизнь – это способ существования белковых тел, существенным моментом которого является *постоянный обмен веществ с окружающей их внешней средой*, причем с прекращением этого обмена веществ прекращается и жизнь, что приводит к разложению белка" (Диалектика природы). Все приведенные критерии, естественно, приложимы к земной жизни, поскольку о существовании внеземных форм жизни ничего неизвестно.

Уже первый, наиболее существенный критерий – обмен веществ с окружающей средой – потребовал уточнения, о чем там же Ф. Энгельс говорит: "И у неорганических тел может происходить подобный обмен веществ, который и происходит с течением времени повсюду, так как повсюду происходят, хотя бы и очень медленно, химические действия. Но разница заключается в том, что в случае неорганических тел обмен веществ разрушает их, в случае же органических тел он является необходимым условием их существования". Аналогичные уточнения требуют и все другие критерии живого. В частности, как неоднократно отмечалось в литературе, способностью к росту за счет вещества «окружающей среды» обладают и кристаллы. С другой стороны, некоторые организмы (мулы, рабочие пчелы) не способны к размножению (воспроизведению себе подобного), хотя, несомненно, являются живыми системами. В то же время у них имеют-

ся еще два типа воспроизведения – отдельных клеток организма и компонентов клетки. В связи с этим английский ученый Пирри (Pirie N.) считал нецелесообразным использовать признак воспроизведения для характеристики жизни. Американский ученый Горовиц (Horowitz N.) предлагал сократить число критериев живой системы до минимума, чтобы найти простейшую химическую систему, проявляющую свойства живого. К таким критериям он отнес изменчивость, самовоспроизведение и гетерогенный катализ, а единственным живым компонентом клетки назвал гены, поскольку все остальные ее компоненты представляют собой продукты генной активности. Отсюда им был сделан вывод: "...жизнь возникла в форме индивидуальных молекул в сложной полимолекулярной среде" [5, с.111]. Полемизуя с ним, А.Е. Браунштейн (СССР) предлагал дополнить этот вывод одним словом: "...многомолекулярном **живом** окружении..." [Там же, с. 112], поскольку неизвестны случаи, когда бы ген или молекула нуклеиновой кислоты функционировали вне живых клеток. Это позволяет отнести к живому все гетеротрофные организмы, вирусы, а также растения, которые без наличия гетеротрофных организмов, обеспечивающих круговорот веществ в природе, не смогли бы длительно существовать. Однако, в связи с дополнением А.Е. Браунштейна, возникает естественный вопрос: откуда в период возникновения жизни на Земле появилось «многомолекулярное **живое** окружение»? Позднее академик В.А. Энгельгардт предложил новые критерии жизни и живого. В одной из своих работ он писал, "что жизнь представляет собой совокупность некоторого числа начал, из которых каждое, взятое в отдельности, недостаточно для того, чтобы обеспечить функционирование живой системы, но при отсутствии хотя бы одного из них эта система разрушается. Одним из таких начал является структурная организация. Мы не можем представить себе, чтобы жизнь имела место в бесструктурной среде, не содержащей определенной, в какой-то мере фиксированной, материальной упорядоченности".

Далее в основе жизни лежит сочетание трех потоков: потока вещества, потока энергии и потока информации. Они качественно глубоко различны, но сливаются в некое единство высшего порядка, которое можно было бы охарактеризовать как «биотическое триединство», составляющее динамическую основу жизни.

Говоря о потоке вещества, естественно задать вопрос: где лежит тот низший уровень материальных образований, на котором мы вправе ожидать возможность первых проявлений жизни? Правомерны ли такие термины, как «живой белок», «живая молекула»? В последнем случае ответ несомненно должен быть отрицательным" [6].

Далее он вместо менее определенного термина «живая материя» рекомендует использовать выражение «живая система». «В качестве нижнего предела ее сложности вырисовывается система из двух компонентов, как это видно на границе между живым и неживым, в простейших вирусах .

Этими обязательными компонентами являются два важнейших класса биополимеров – белки и нуклеиновые кислоты. Без наличия их совокупности нам неизвестны никакие системы, которые могли бы быть отнесены к числу живых. Более того, мы в принципе можем отвергнуть возможность существования живых систем, не содержащих оба указанных компонента" [6].

Следует заметить, что вирусы, которые, по мнению В.А. Энгельгардта, стоят на границе между живым и неживым, хотя и состоят из двух этих обязательных компонентов, не являются организмами, так как будучи внутриклеточными (генетическими) паразитами [8] для своей репликации требуют «многомолекулярного живого окружения».

Все сказанное выше свидетельствует о чрезвычайной сложности вопроса о критериях живых систем, о сущности феномена жизни. В частности, В.А. Энгельгардт, отмечая успехи на пути искусственного создания простейших форм живого, писал: "Оказалось, что не найдено даже исчерпывающего ответа на вопрос о различии живого и неживого. Теперь мы сталкиваемся с парадоксом иного порядка. Быть может, мы получим нечто живое, не зная до конца, что же такое жизнь. Но это не должно нас ни в коей мере обезоруживать в поисках" [6]. Поэтому в настоящее время при определении сущности живого приходится использовать рассмотренные ранее не достаточно строгие критерии, разъясняя вкладываемый в них конкретный смысл с помощью дополнительных комментариев. Можно лишь отметить, что в работах отечественных и зарубежных ученых, занимающихся проблемой возникновения жизни на Земле, часто прослеживается опора на критерии живых систем, которые даны в работах В.А. Энгельгардта (структурная организация; три потока: вещества, энергии, информации; обязательные компоненты живого – белки и нуклеиновые кислоты; самовоспроизведение живого посредством матричного синтеза и др.).

18.3. Происхождение Земли и Солнечной системы

Разработка моделей возникновения жизни на Земле путем естественной трансформации неживой материи в живые системы невозможна без знания физических и химических условий, в которых про-

текал этот процесс. Вопросы происхождения и эволюции небесных тел, в число которых входит и наша планета, решаются учеными в рамках специального раздела астрономии, называемого космогонией. В своих исследованиях они используют два основных подхода. Первый подход является чисто теоретическим: основываясь на исходных (в настоящий момент) характеристиках небесного тела и законах физики, рассчитывают траекторию его развития в прошлом. Второй подход основан на сравнительном анализе наблюдаемых характеристик небесных тел, находящихся на разных стадиях развития. Этот путь дает наиболее достоверную информацию, но, к сожалению, практически неприменим к планетам, поскольку астрономам известна всего лишь одна планетная система – Солнечная. В связи с этим в планетной космогонии приходится пользоваться лишь только первым подходом, результаты которого практически невозможно проверить [9].

Учеными был предложен ряд исторически сменяющих друг друга гипотез происхождения Земли и Солнечной системы, в состав которой входит наша планета. В XVIII веке немецким философом И. Кантом и французским астрономом и механиком П.С. Лапласом была выдвинута гипотеза происхождения Солнечной системы. Гипотеза Канта-Лапласа пользовалась более ста лет признанием и популярностью. Согласно ей, Солнечная система образовалась из огромной раскаленной газоподобной туманности, вращавшейся вокруг оси. Первоначально размеры этой туманности во много раз превосходили современные размеры Солнечной системы. Авторы гипотезы не давали ответа на вопросы о происхождении туманности и причинах, обусловивших названное состояние ее. Используя известные в то время законы механики, Лаплас описал последующую динамику вещества туманности. Поскольку с течением времени туманность остывала, размеры ее сокращались, а скорость вращения увеличивалась. Постепенно она все более сплющивалась, ее вещество концентрировалось по экватору и стремилось под действием гравитации приблизиться к оси вращения туманности. Оторвавшееся под действием центробежной силы от центрального сгустка туманности, образовавшего впоследствии Солнце, вещество продолжало вращаться. Из него сформировались планеты. От планет также отделилось вещество, из которого возникли спутники планет. После образования планет происходило их охлаждение и формирование твердой оболочки и атмосферы. Образование планет и их спутников, согласно гипотезе Канта-Лапласа, началось до того, как окончательно сформировалось Солнце.

Гипотеза Канта-Лапласа не смогла объяснить большой ряд фактов и к началу XX века уступила место гипотезе Джинса, которая просуществовала 20 лет. Согласно гипотезе английского физика и астрофизика Д.Х. Джинса, материя, из которой затем образовались планеты и их спутники, была вырвана из Солнца притяжением пролетевшей поблизости звезды, обладавшей значительной массой. Притяжение звезды увлекло вырванное вещество далеко от Солнца в направлении ее движения. Таким образом, в основе гипотезы Джинса лежит случайность (пролет вблизи Солнца звезды). Проведенные впоследствии расчеты показали несостоятельность гипотезы Джинса.

Среди других моделей возникновения Солнечной системы следует назвать гипотезу академика В.Г. Фесенкова, согласно которой в недрах звезд происходит выделение громадного количества энергии, вследствие чего они находятся в виде раскаленных газовых шаров, излучающих световую и тепловую энергию. По мнению В.Г. Фесенкова, в то время, когда Солнце было еще молодой звездой, произошла смена одного типа ядерных реакций на другой, отчего оно стало быстро сжиматься и быстрее вращаться вокруг своей оси. Это обстоятельство вызвало увеличение центробежной силы и, как следствие, образование длинного выступа, который затем оторвался и распался на отдельные планеты. Однако и гипотеза В.Г. Фесенкова вызвала ряд возражений, которые оказалась не в состоянии объяснить.

В 40-х годах XX века академик О.Ю. Шмидт предложил совершенно новую теорию происхождения Земли и других планет. Согласно теории О.Ю. Шмидта, образование планет вокруг звезд – явление закономерное. В состав любой Галактики кроме звезд входит бесчисленное множество темных туманностей, представляющих собой скопления холодных пылевидных и более крупных частиц типа метеоритов. Звезды при своем движении время от времени попадают в те области мирового пространства, где таких пылевидных скоплений (облаков) особенно много. Солнце при прохождении через пылевидное облако захватило из него огромный рой частиц, которые под влиянием притяжения со стороны громадной массы Солнца стали вращаться вокруг него по замкнутым траекториям. В рое таких частиц, окружавших Солнце, возникли отдельные сгущения, которые объединились друг с другом и превратились в конечном счете в несколько больших планет.

Таким образом, по теории О.Ю. Шмидта, материал, из которого образовались планеты и в том числе Земля, имеет галактическое происхождение; планеты образовались не из раскаленных газов или

газоподобного вещества, а из холодных твердых и пылевидных частиц. Первоначально Земля была холодной. Когда ее размеры стали достаточно большими (за счет постоянного захвата вещества из пылевидных скоплений), начался разогрев земных недр. Он произошел в результате выделения тепла от распада имевшихся в веществе Земли радиоактивных элементов, при этом ее недра нагрелись до температуры 1500-2000°, которой соответствует пластическое состояние вещества. Благодаря этому произошло расслоение Земли на отдельные оболочки: более плотное вещество сосредоточилось ближе к ее центру, более легкое – у ее периферии [10].

Помимо рассмотренных моделей были предложены и другие; в частности, много общих моментов с теорией О.Ю. Шмидта имеет модель американского физика и физико-химика, лауреата Нобелевской премии Г.К. Юри. Он не исключает возможности сильного (но не выше 900°) разогрева поверхности Земли при аккреции частиц (гравитационном захвате и последующем падении их на планету), которая сопровождается выделением энергии.

18.4. Физико-химические условия на первобытной Земле

Исходя из того, что жизнь на нашей планете возникла из земного вещества, для последующих теоретических построений и экспериментального моделирования необходимо иметь представление о химическом составе этого вещества и источниках энергии, способных стимулировать процессы его трансформации в период, предшествующий появлению простейших биосистем, и в последующее время. Источниками сведений служат: информация о химическом составе атмосфер планет, полученная с помощью спектрального метода и космических аппаратов; сравнительный анализ химического состава атмосфер планет с близкими к земным физическими условиями; результаты лабораторного моделирования процессов, предположительно имевших место на ранних стадиях развития Земли; данные теоретического анализа эволюции планет с учетом возможных изменений солнечной активности и некоторые иные косвенные данные.

В появлении биологических систем на ранее безжизненной Земле принимали непосредственное участие все три сферы планеты: литосфера, гидросфера и атмосфера.

Современная литосфера (сиалическая оболочка) располагается от поверхности земли до глубины 5-80 км. Толщина ее в среднем равна 60 км. Эту оболочку часто называют земной корой. Она состоит из магматических, метаморфических и осадочных горных пород. В

состав вещества литосферы кроме кислорода входят главным образом кремний (Si) и алюминий (Al), поэтому ее называют сиалической и сокращенно обозначают Sial. Сиалическая оболочка делится на гранитную и базальтовую геосферы. Первая располагается до глубины в среднем 16-20 км, вторая находится под ней. Гранитная оболочка состоит преимущественно из горных пород кислого состава, базальтовая – из более основных пород [10].

Под корой располагается мантия Земли, отделенная от коры так называемым слоем Махровичича.

Литосфера является и в период возникновения жизни являлась источником прежде всего атомов металлов (Si, Al, Fe, Ca, Mg, Na, K и др.), без которых невозможно существование биологических систем, а также некоторых органических веществ.

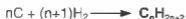
Проявление жизнедеятельности невозможно без воды, в которой, как полагают, зародилась жизнь и которая составляет большую долю массы организмов. По расчетам ученых [11], на первобытной Земле имелось менее одной десятой массы воды современных океанов, а остальные девять десятых образовались позднее за счет дегазации внутренних частей планеты. Ювенильная вода, из которой состояли первоначально воды океанов, уже содержала различные минеральные соли. Обогащение ее химическими элементами происходило постепенно, в результате круговорота воды в природе, при котором реки размывали материковые породы и уносили продукты размыва обратно в моря и океаны. В конечном счете создавалась водная среда, богатая всевозможными химическими элементами литосферы, подготовленная к возникновению в ней жизни [12].

По вопросу о величине pH первобытного океана существуют противоречивые мнения. Одни ученые полагают, что его воды были кислыми за счет кислых компонентов вулканических извержений (CO_2 , H_2S , SO_2), а затем произошла его нейтрализация катионами, вымываемыми из магматических пород. Более широкое распространение получила точка зрения других ученых, полагающих, что первобытный океан изначально был слегка щелочным (pH 8-9) в результате взаимодействия кислых летучих продуктов дегазации земных недр со щелочными компонентами мощной базальтовой коры. При этом отмечается, что решающую роль в протобиогенезе могли сыграть локальные особенности водоемов, в которых значение pH в ту или иную сторону отклонялось от средней для Мирового океана величины [11].

Нет единого мнения и по вопросу о концентрации микромолекул, прежде всего органических, в первобытных водных бассейнах. Ряд авторов критикуют широко распространенное представление о высокой концентрации таких веществ в «первичном бульоне». По их мнению, постоянное облучение большими дозами ультрафиолета гомогенного раствора образовавшихся в атмосфере органических веществ ведет к их распаду. Концентрирование органических веществ в количествах, необходимых для дальнейшей эволюции, опять же могло происходить локально за счет адсорбции, высыхания лагун, в результате отступления морей и т.д. [11].

Представление различных ученых об эволюции атмосферы Земли также неоднозначно. В известной мере это расхождение мнений обусловлено разным подходом к вопросу о температуре земной поверхности в период образования атмосферы. В условиях высокой температуры поверхности в атмосфере могли находиться небольшие количества водорода и гелия, однако в связи с относительно малой массой Земли и этих молекул первичная атмосфера была утеряна путем диссипации (рассеяния) в межпланетное пространство. Современная, вторичная атмосфера сформировалась лишь в процессе последующей эволюции Земли.

В период разогрева нашей планеты графит и карбиды металлов, реагируя с конституционной водой земных недр, в условиях высоких температур давали метан и другие углеводороды, поступающие в атмосферу:



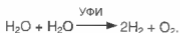
При взаимодействии с водой нитриды металлов дают аммиак:



Аналогично карбидам и нитридам сернистые металлы явились источником образования небольших количеств сероводорода первичной атмосферы [2].

Через тектонические разломы коры и с вулканическими выбросами эти газообразные продукты поступали в атмосферу.

Такая сильно восстановленная атмосфера не могла все время сохраняться неизменной. Вследствие ультрафиолетового излучения (УФИ) Солнца в верхних слоях атмосферы происходило фотохимическое разложение воды:



Возникающий при этом свободный водород диссипировал в межпланетное пространство, а кислород окислял аммиак до молекулярного азота:



и превращал углеводороды в разнообразные окисленные органические соединения (спирты, альдегиды, кетоны, органические кислоты). Конечным продуктом этого окисления явились окись углерода и углекислота, давшая начало процессу образования первичных карбонатов. Одновременно происходило и непосредственное фотохимическое изменение метана и аммиака. Метан при этом образовывал водород, высшие углеводороды и ненасыщенные углеводороды, в частности, этилен, который мог фотохимически превращаться в ацетилен и целый ряд жидких углеводородов. Аммиак фотохимически распадался на NH_2 и H , при этом возникали гидразин $\text{NH}_2 - \text{NH}_2$ и другие азотистые вещества. Существенную роль в синтезе разнообразных органических соединений играли образующиеся в атмосфере свободные радикалы типа CH_3 , CH_2 , CH , NH_2 , NH , OH .

Возникающий при фотолизе кислород реагировал не только с аммиаком и углеводородами, но окислял также другие восстановленные вещества, например, сероводород и металлы, в частности железо. Поэтому длительное время, несмотря на постоянно идущий фотолиз воды и улетучивание водорода, свободный кислород не накапливался в земной атмосфере в значительных количествах.

Многие газообразные соединения, образующиеся в процессе формирования атмосферы, избежали процессов интенсивной диссипации и окисления благодаря хорошей растворимости в воде, где они нередко давали новые, порою органические соединения, например муравьиную кислоту (при pH 8-9):



Медленное превращение восстановительных условий в окислительные сменилось быстрым лишь 700–800 млн. лет назад благодаря появлению нового биологического процесса образования кислорода – фотосинтеза, которому принадлежит ведущая роль в формировании современной атмосферы [2].

Таким образом, с момента образования Земли (ориентировочно, 5 млрд. лет назад) до появления фотосинтезирующих организмов процессы возникновения жизни происходили в условиях восстановительной атмосферы, хотя некоторые авторы считают, что в тот период атмосфера содержала большие количества углекислого газа. Исходя из этого, в модельных экспериментах используются три основных состава первичной атмосферы: восстановительная, с высоким содержанием аммиака (CH_4 , NH_3 , H_2O , H_2), слабокислая, с низким содержанием аммиака (CO_2 , CH_4 , NH_3 , N_2 , H_2O) и нейтральная (CH_4 , N_2 , H_2O) [13].

Гидросфера, в которой, по мнению большинства авторов, возникла жизнь, непрерывно пополнялась разнообразными химическими соединениями абиогенного происхождения из находившихся с ней в контакте литосферы и атмосферы, что создавало условия для образования макромолекул.

Немаловажную роль в возникновении жизни на Земле играли источники энергии. Последняя необходима для образования как простых, так и сложных соединений, а также ускорения химических реакций. Синтез биологически важных молекул из простых исходных соединений возможен только в случае обеспечения реакций достаточным количеством свободной энергии (энергии активации). Практически значимыми в этом отношении являются солнечное излучение, радиация, тепло земных недр, электрические разряды и, возможно, удары метеоритов. Следует отметить, что доля участия каждого вида энергии в процессе возникновения жизни на Земле определяется не только его валовым (калорическим) вкладом, но и «качеством» энергии, то есть способностью непосредственно быть использованной в механизме протекания реакции.

Обычно количество энергии, поступающей на Землю извне и образующейся на ней в ранний период истории планеты, рассчитывают исходя из современных условий и различного рода допущений. Доля конкретных видов энергии, рассчитанная нами по данным [11], на современной Земле составляет (в процентах): общий поток солнечного излучения в видимой части спектра – 99,9642; солнечное излучение с длиной волны менее 200 нм – 0,0283; радиация высокой энергии (из глубины коры 35 км) – 0,0059; теплота вулканических извержений

(только породы и лава) – 0,0001; электрические разряды – 0,0015. Она же в расчете на условия примитивной Земли ($4,0 \cdot 10^9$ – $4,5 \cdot 10^9$ лет назад) соответственно составляла: 99,9517; 0,0176; 0,0282; 0,0001; 0,0024. Из этих данных следует, что доля энергии УФВ в тот период была ниже, а радиации и электрических разрядов – существенно выше современного уровня. Кроме того, обращает на себя внимание крайне низкая доля валовой (калорической) энергии всех названных ее источников по сравнению с общим потоком солнечного излучения в видимой области спектра. Казалось бы, что при решении проблемы возникновения жизни на Земле имеет смысл учитывать лишь последний источник энергии. Однако в отношении своего «качества» он оказался в тот период крайне неэффективным, и эта «несправедливость» была устранена лишь с появлением фотосинтезирующих организмов, сделавших видимый свет основным источником своего (и, косвенно, гетеротрофов) энергообеспечения. Дело том, что энергия квантов видимого света недостаточна для непосредственной активации химических реакций. Неудивительно поэтому, что Кальвин [14] даже не включил видимый свет в число возможных источников энергии для первичной химической эволюции. Согласно его расчетам, среднее количество энергии, приходящееся на всю поверхность Земли (10^{20} кал/год), составляет:

Распад K^{40} (в настоящее время)	0,3
То же $2,6 \cdot 10^9$ лет назад	1,2
УФВ с $\lambda < 150$ нм	0,08
То же с $\lambda < 200$ нм	4,5
Вулканизм (лава при $1000^\circ C$)	0,04
Удары метеоритов	0,05 (вероятно)
Молнии	0,05.

В процентах доля этих видов по нашим расчетам ($2,6 \cdot 10^9$ лет назад) составила соответственно 20,27; 1,36; 76,01; 0,68; 0,84; 0,84. Таким образом, среди названных источников наибольшая доля энергии приходится на УФВ с длиной волны короче 200 нм (76,01%) и радиоактивный распад естественного изотопа K^{40} (20,27%), что в сумме составило 96,28%, на остальные виды энергии приходилось менее 4%. Однако и эти значения не дают адекватного представления о

реальном вкладе каждого источника энергии в процесс возникновения жизни на Земле. Эффективность УФИ обусловлена относительно высокой энергией кванта, способного возбудить и ионизировать молекулы; одна корпускула радиоактивного излучения при взаимодействии с веществом образует в нем до сотен тысяч пар ионов; тепловой энергии вулканической лавы с температурой до 1000°C достаточно для активации большого числа химических реакций; при соударении метеоритов с атмосферой и земной поверхностью помимо высокой температуры (тысячи градусов) создается очень большое давление (тысячи атмосфер); электрические разряды, будучи потоком быстро движущихся заряженных частиц (электронов, ионов), вызывают локальное повышение температуры, приводящее к появлению радикалов и электронно-возбужденных состояний компонентов атмосферы, что, вероятно, внесло существенный вклад в эволюцию микромолекул [11]. Реальная возможность названных видов энергии влиять на состояние атмосферы первичной Земли проверялась в многочисленных модельных экспериментах в лабораториях отечественных и зарубежных ученых.

18.5. Лабораторное моделирование начального этапа возникновения жизни на Земле

Опыты по моделированию в лабораторных условиях начальных этапов химической (добиологической) эволюции были начаты еще в конце XIX века, но наиболее основательно они проводились с 50-х годов прошлого столетия. В качестве газовой среды, на которую воздействовали различными физическими факторами, использовались, как правило, бескислородные смеси.

Один из первых экспериментов, положивших начало широкому фронту работ по лабораторному моделированию процессов, предположительно имевших место в первичной атмосфере, был проведен в США в 1950 г. с участием Кальвина (Calvin M.). Смесь, состоящую из углекислого газа, водорода, воды и Fe^{2+} , в растворе облучали ионами гелия с энергией 40 МэВ, генерируемыми в циклотроне. В этом эксперименте, моделирующем радиоактивность земной коры, были получены различные органические соединения, среди которых преобладали муравьиная кислота и формальдегид. К сожалению, в этой простой по составу смеси не было аммиака (или азота) и метана [14].

Дозе (Dose K.) и Раевский (Rajewsky B.) в 1957 г. впервые показали, что при воздействии ионизирующей радиации (рентгеновских лучей в дозах 10^6 – 10^8 рад) на газовые смеси, содержащие метан, окись и двуокись углерода, пары воды, аммиак, азот и водород в различных соотношениях, образуются аминокислоты и родственные им соединения. Среди полученных продуктов глицин, аланин, аспарагиновая кислота, метиламин, этиламин, уксусная, янтарная, молочная и пировиноградная кислоты. Наиболее подходящей для синтеза аминокислот оказалась смесь, содержащая в качестве источника углерода метан и углекислый газ, в качестве источника азота – аммиак [11].

Берджер (Berger R., 1961) облучал протонами смесь метана, аммиака и паров воды. Среди продуктов реакции были обнаружены мочевины, ацетамид и ацетон. Пальм (Palm C.) и Кальвин (Calvin M., 1962) после облучения сходной смеси быстрыми электронами (5 МэВ), полученными в линейном ускорителе, в органических продуктах реакции выявили мочевины, молочную кислоту, аланин, глицин и в значительных количествах цианистый водород.

Оро (Oro J.), используя установки Пальма и Кальвина для облучения, показал, что аминокислоты и оксикислоты образуются в случае замены аммиака азотом, а метана – этаном. Более того, он обнаружил, что аминокислоты синтезируются даже тогда, когда газовая смесь находится в твердом состоянии при температуре жидкого азота (имитация условий космического пространства).

Поннамперума (Ponnamperuma S.A.) и Мэк (Mack R.) в 1965 г. показали, что при облучении смеси метана, аммиака и паров воды быстрыми электронами (4,5 МэВ) помимо аминокислот и других органических соединений образуются аденин и некоторые сахара, включая пентозы и гексозы. При облучении β -частицами такой же смеси, дополнительно включающей сероводород, образуются аминокислоты: таурин, цистеиновая кислота и цистамин [11].

Ведущую роль на начальных этапах биологической эволюции радиации отводил А.М. Кузин [31]. Углеводороды, образующиеся в рифтовых зонах подводных хребтов как результат взаимодействия карбидов железа и других металлов с водой, представляли собой стабильные в химическом отношении молекулы. Чтобы вовлечь их в химический круговорот, нужны были более мощные источники энергии, чем видимое и ультрафиолетовое излучение с энергией кванта E в несколько эВ ($E=1230/\lambda$ [эВ], λ выражена в нм). Такой энергией, на многие порядки превышающей энергию квантов оптического диапазона, обладает ионизирующая радиация. Она разрывает любые связи внутри молекул углеводородов, образуя свободные радикалы,

способные вступать в реакции с такими элементами, как азот, кислород, которые вместе с углеродом и водородом составляют 97% живой материи. Важную роль в синтезе органических молекул (и обогащении первичной атмосферы свободным кислородом) играл процесс радиолитического распада воды, один из продуктов которого – гидроксильный радикал – способствовал образованию окисленных карбонильных соединений. Источниками радиации могли быть космическое излучение, способное проникать в океанические глубины, и радиоактивность горных пород, выстилающих дно океанов. Образующиеся органические соединения диффундировали к водной поверхности и подвергались дальнейшим превращениям (конденсации, полимеризации и др.) с участием УФ-излучения, которое не способно проникать на значительные глубины и полностью поглощается верхними слоями воды.

Другим фактором, который имитировал воздействие гроз на первичную атмосферу Земли, был электрический разряд. В зависимости от значения напряженности и формы электродов он может быть тихим или искровым. Последний происходит с участием двух электродов при более высокой напряженности. Первые опыты с использованием искровых разрядов были выполнены в 1953 г. Миллером (Miller S.L.). Его прибор очень прост (рис. 18.1).

Электрический разряд происходит в большой колбе, заполненной газом. Малая колба с кипящей водой и конденсатор обеспечивают непрерывную циркуляцию водяного пара через реактор и отбор из него образующихся продуктов реакции. Последние попадают в ловушку и в любое время могут быть взяты для химического анализа. Основными продуктами, обнаруженными в этих экспериментах, были: цианистый водород, альдегиды и аминокислоты. Аммиак с течением времени исчезает, а концентрация аминокислот растет до определенного значения. Концентрация промежуточных соединений HCN и альдегидов вначале увеличивается, а затем убывает (рис. 18.2).

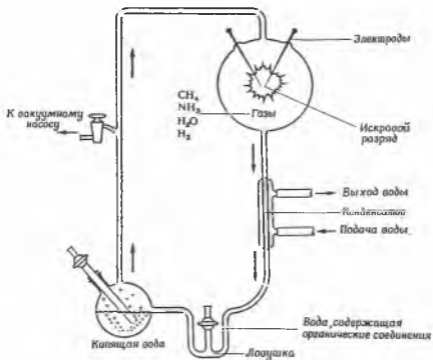


Рис. 18.1. Прибор Миллера для синтеза аминокислот при помощи электрического разряда [14]

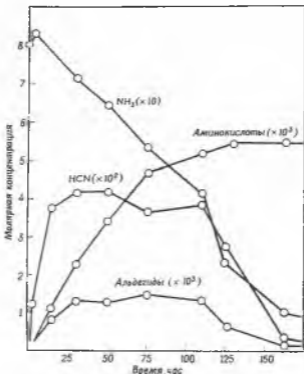
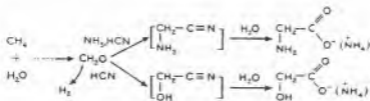
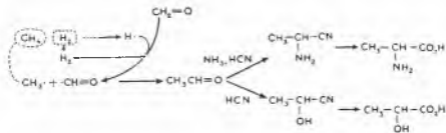


Рис 18.2. Концентрация аммиака, цианистого водорода и альдегидов в U-образной трубке (повушке) прибора Миллера и аминокислот в малой колбе при воздействии искры на смесь метана, аммиака, воды и водорода [14]

Эти кинетические кривые позволили Миллеру предположить последовательную цепочку реакций, ведущих к образованию конечных продуктов (цит. по [14]). Вначале происходит ионизация метана, затем реакция с водой, дающая метиловый спирт, и вторичная ионизация, в конечном счете дающая формальдегид. Последний затем реагирует с HCN и аммиаком в типичном синтезе А. Штрекера (1850), что дает либо гликолевую кислоту (оксикислоту), либо соответствующую аминокислоту (глицин). Нитрильные группы, которые после гидролиза дают карбоксильную группу, присоединяются сначала к карбониевому углероду. Затем происходит реакция с водой или аммиаком (в зависимости от того, какие молекулы преобладают), и на следующем этапе образуются гидроксильные или аминосоединения:



Аналогичного типа реакции можно предположить и для ацетальдегида. Происходит ионизация метана с образованием атома водорода и метильного радикала; атом водорода отнимает другой атом водорода от формальдегида и вновь дает H_2 и формильный радикал, который затем может реагировать далее с образованием ацетальдегида:



Помимо глицина и аланина в небольших количествах были обнаружены аспарагиновая и глутаминовая кислоты.

Применение ультрафиолетового излучения (УФИ) с длиной волны менее 200 нм, имитирующего участие солнечного света в возникновении жизни на Земле, связано с определенными техническими сложностями, поскольку традиционно применяемое при работе с ультрафиолетом кварцевое стекло сильно поглощает его в этом диапазоне. При воздействии на газовую смесь (метан, аммиак, пары воды) при 55° УФИ криптоновой (116,5 и 123,5 нм) и ксеноновой (129,5 и 147,0 нм) ламп в 50-х годах Гроту (Groth W.) и Вейсенгофу (von Weysenhoff H.) удалось обнаружить следы глицина и аланина. При облучении ртутной лампой (185 нм) аминокислоты вообще не образовывались. В 1961 г. Н. Додонова и А.А. Сидорова сообщили о получении глицина, аланина, валина и норлейцина, а также ряда иных органических соединений (мочевина, формальдегид и др.) при воздействии УФИ в области от 145 до 180 нм на смесь метана, аммиака и паров воды.

Более богатыми по аминокислотному составу оказались продукты, полученные в 1964 г. Фоксом (Fox S.W.) при термическом воздействии (950 и 1050°) в присутствии кремнезема или глинозема на газовую смесь (метан, аммиак, пары воды). Ученый использовал прибор (рис. 18.3), сходный с тем, который использовал Миллер в экспериментах по электрическому разряду. Различие состояло лишь в том, что реактором служила не искровая камера, а горячая трубка (справа снизу).

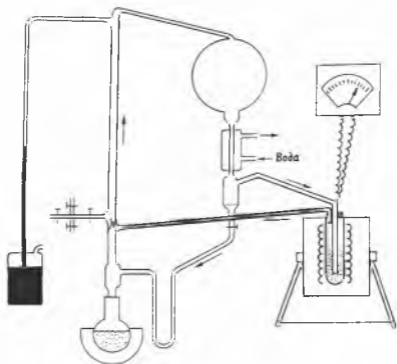
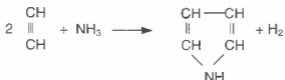


Рис. 18.3. Прибор закрытого типа, в котором осуществляется циркуляция реагирующих газов [14]

Были получены аминокислоты: глицин, аланин, треонин, серин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, пролин, валин, изолейцин, а также ряд других органических соединений. Ацетилен и его гомологи при высоких температурах (красного каления) дают ароматические углеводороды (реакция М. Бергло). В присутствии катализаторов эта

реакция проходит при значительно более низких температурах и с хорошим выходом бензола. А. Чичибабин показал, что в присутствии окислов металлов (Al_2O_3 , Fe_2O_3 , Cr_2O_3) при 300° из смеси ацетилена и аммиака образуются пиррол



и некоторые пиридиновые основания. Не исключено, что эти реакции имели место при синтезе ароматических аминокислот (тирозина, фенилаланина, триптофана). Бензол и толуол также были получены Поннамперумом и Веллером (Woeller F.) из чистого метана с использованием электрической дуги.

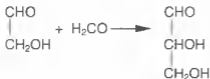
Помимо аминокислот к числу «строительных блоков» биологических макромолекул относятся моносахариды, пурины, пиримидины, жирные кислоты.

Еще в XIX веке было известно, что формальдегид в водных растворах легко конденсируется с образованием сахаров в присутствии основных катализаторов. В 1953 г. Мариани (Mariani E.) и Торрака (Torraca C.) обнаружили, что при конденсации формальдегида в основной среде образуется около тридцати различных моносахаридов, причем пентозы и гексозы образуются легче, чем моносахариды с меньшим или большим числом углеродных атомов, что объясняется наличием у пентоз и гексоз циклической структуры, стабилизирующей молекулу.

Полагают, что процесс начинается с относительно медленной конденсации двух молекул формальдегида:

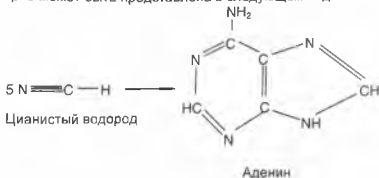


Дальше реакция протекает быстрее:

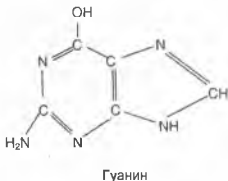


В ходе этих реакций затем последовательно образуются тетрозы, пентозы, гексозы и т.д.

Пурины и пиримидины относятся к числу незаменимых компонентов нуклеиновых кислот, а ряд производных аденина входит в состав коферментов. Начиная с 1960 г. Оро и его сотрудники, нагревая растворы цианистого водорода в водном аммиаке в течение нескольких дней при умеренной температуре, получили сложную смесь продуктов реакции, из которой при помощи хроматографии выделили аденин. Была предложена частично подтвержденная экспериментами схема синтеза аденина, которая суммарно может быть представлена в следующем виде:

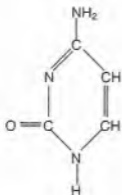


При облучении ультразвуком разбавленных растворов синильной кислоты удалось обнаружить аденин и гуанин



Пиримидины также были получены различными путями из достаточно простых исходных соединений. В частности, при действии

электрических разрядов на смесь метана и азота получают цианакетилен $\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$. Сплавляя его с мочевиной $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, получили цитозин

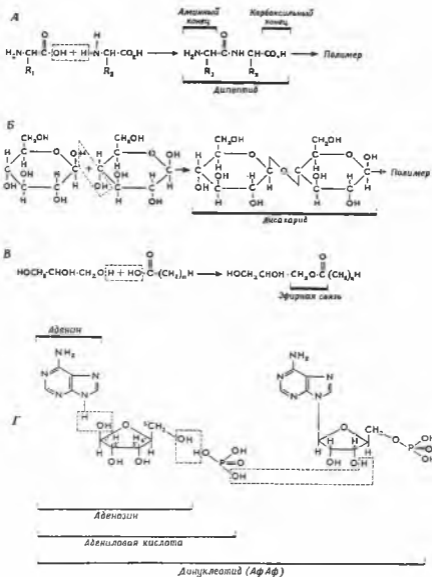


Также были синтезированы урацил и тимин.

Практически при действии всех рассмотренных выше физических факторов на газовые смеси образуются органические кислоты (муравьиная, уксусная, пропионовая, молочная, янтарная). При действии на смесь метана и паров воды электрического разряда, приближающегося к коронному, получили продукты реакции, среди которых оказались монокарбоновые кислоты с длиной цепи от 2 до 12 углеродных атомов.

18.6. Образование макромолекул

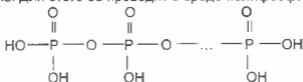
Рассмотренные выше лабораторные эксперименты позволили получить множество простых соединений различной химической природы, существенная часть которых относится к молекулам, нередко называемым строительными блоками (аминокислоты, моносахариды, пуриновые и пиримидиновые основания, жирные кислоты и др.), из которых в клетках синтезируются биологические макромолекулы. В большинстве случаев образование макромолекул происходит путем полимеризации, или, как часто говорят, дегидратационной конденсации этих строительных блоков, при которой от них отщепляются молекулы воды. Таким путем, в частности, синтезируются основные компоненты биологических структур клетки – полипептиды (А), полисахариды (Б), липиды (В), нуклеиновые кислоты (Г) [14]:



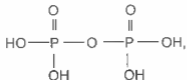
Реакциям полимеризации (в большинстве случаев – сополимеризации) строительных блоков противостоит деполимеризация биомолекул путем гидролиза, которая имеет малую энергию активации и протекает с минимальным расходом энергии. Дегидратационная конденсация, напротив, связана с подводом энергии в зону реакции. На-

пример, для образования одной пептидной связи из двух аминокислот в условиях разбавленных водных растворов в среднем нужно затратить 3000 кал/моль, хотя по мере увеличения длины полипептида присоединение новой аминокислоты облегчается и значение этой энергии существенно уменьшается. В связи с преобладанием энергии активации синтеза над гидролизом выход пептидов в водных растворах крайне низок. Поэтому полимеризацию аминокислот в модельных экспериментах осуществляют при температуре выше 100°, когда вода, необходимая для гидролиза, испаряется, благодаря чему происходит сдвиг равновесия в сторону образования пептидов. Нередко сразу берут смесь сухих аминокислот, содержащих в качестве обязательного компонента не нейтральные аминокислоты (например, аспарагиновую и глутаминовую кислоты), и выдерживают ее в течение одной недели при 120°, либо 6-10 часов при 170 или 180°. Изменяя соотношение аминокислот в реакционной смеси, можно получить кислый, нейтральный или основной продукт сополимеризации. Он содержит все аминокислоты, которые имелись в исходной реакционной смеси, если конденсацию осуществляют при температуре не выше 130° с включением в реакционную смесь некоторых защитных веществ, благодаря чему сохраняются неразрушенными серин, треонин и цистеин.

Дегидратационную конденсацию аминокислот с выходом продуктов реакции до 35% можно осуществлять и при температуре 60° и ниже. Для этого ее проводят в среде полифосфатов:



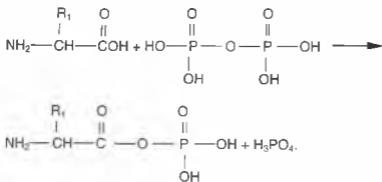
или самого низшего их гомолога – пирофосфата (дифосфата):



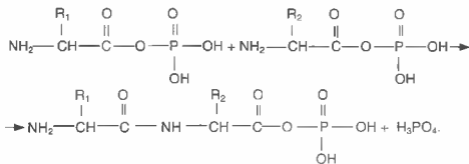
представляющего собой продукт дегидратационной конденсации двух молекул ортофосфата H_3PO_4 :



Связь между остатками двух ортофосфатов в пирофосфате содержит потенциальную химическую энергию, которая может высвобождаться для активации органических соединений. Активирование аминокислоты пирофосфатом завершается образованием фосфорного эфира аминокислоты:



При переносе фосфата на глицин часть энергии теряется, но сложноэфирная связь фосфата содержит вполне достаточное количество энергии для образования активированного дипептида с фосфорным эфиром другой аминокислоты:



Аналогичным образом к растущей цепи присоединяются остатки других активированных аминокислот. В случае использования в качестве источника энергии полифосфата после каждого акта присоединения активированной аминокислоты к растущему полипептиду длина самого полифосфата, напротив, будет укорачиваться на один остаток ортофосфата.

По мнению немецкого биохимика Шрамма (Schramm G.) и американского биохимика К. Поннамперумы, а также ряда других исследователей, в условиях, которые существовали на первичной Земле, например при извержении вулканов и выщелачивании апатитов, могли образовываться залежи высокополимерных (до 500 фосфорных остатков) полифосфатов, энергии одной молекулы которых достаточно для синтеза крупной молекулы полипептида. С другой стороны, в условиях первичной Земли, как полагают, пиррофосфат мог образоваться из ортофосфата как за счет энергии неорганических окислительно-восстановительных реакций, так и за счет предварительной активации фосфата цианистыми соединениями.

Полифосфаты, включая пиррофосфат, были одними из первых энергоносителей на ранних этапах формирования биосистем. У современных организмов они почти полностью передали свою функцию более эффективным переносчикам энергии, среди которых ведущая роль принадлежит молекулам АТФ.

Продукты дегидратационной полимеризации аминокислот (протеиноиды) обладают целым рядом свойств, присущих компонентам, образующимся биогенным путем. Они содержат пептидные связи, подвергаются (хотя и не полностью) гидролизу в условиях *in vitro*, перевариваются в пищеварительном тракте животных, усваиваются различными бактериями, денатурируют при нагревании в водном растворе, могут быть осаждены из него теми же агентами, которые применяют для осаждения белков (ТХУ, пикриновая, фосфорновольфрамовая кислоты и др.), способны высаливаться в слабых солевых растворах, при электрофорезе ведут себя как амфотерные полимеры и т.д.

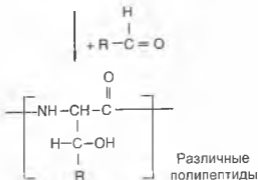
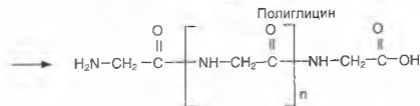
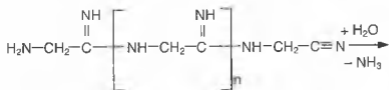
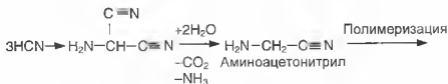
Многие протеиноиды, подобно ферментам, обладают хотя и слабо выраженной каталитической активностью. Они ускоряют реакции гидролиза, декарбоксилирования, аминирования и дезаминирования, а также окислительно-восстановительные реакции. Для них характерна зависимость активности от pH, кинетика Михаэлиса-Ментен.

При термической сополимеризации смеси аминокислот, входящих в состав активного центра меланоцитстимулирующего гормона (глутаминовая кислота, глицин, гистидин, аргинин, фенилаланин и триптофан), были получены фрагменты гормонального белка, сохранившие его активность.

Однако обнаружены и отличия протеиноидов от пептидов естественного происхождения. В частности, между пептидными цепями образуются поперечные связи (между лизином и аспарагиновой кисло-

той), которые не встречаются в белках. Наличием поперечных связей объясняется неполный гидролиз протеиноидов.

Оригинальную схему абиогенного образования пептидов предложил японский ученый Акабори (Akabori S.). В результате полимеризации молекул HCN через ряд промежуточных стадий образуется аминокетонитрил, из которого путем дальнейшей полимеризации получается простейший полипептид – полиглицин. Разнообразные полипептиды образуются вследствие замены одного из атомов водорода при α-углероде на соответствующий радикал [14]:



Иной точки зрения на образование полипептидов придерживаются авторы низкотемпературной теории происхождения жизни, румынские ученые Симионеску (Simionescu C. I.) и Денеш (Denes F.). Согласно их теории, основным источником энергии, инициировавшим реакции в химический период эволюции жизни на Земле, была холодная плазма (ионизированный газ, в котором концентрации положительных и отрицательных зарядов равны), вызывавшая образование активных частиц – радикалов в газовой фазе при низком атмосферном давлении. Рекомбинация радикалов на матрицах (например, на апатитах) привела к образованию макромолекулярных соединений и далее – протобиополимеров, «выживанию» которых способствовало наличие на планете обширных поверхностей с низкой температурой. Основными компонентами атмосферы, по мнению авторов, были аммиак, метан и вода. Свою теорию авторы проверяли на экспериментальной лабораторной установке (рис. 18.4). Она представляла собой колбу емкостью 6 л, в которой моделируемая смесь газов находилась при низком давлении (2-4 мм рт. ст.) и подвергалась воздействию ЭМИ высокочастотного генератора (13,6 МГц, 5 кВт). Образующиеся продукты реакции адсорбировались поверхностью льда, находящегося в нижней части колбы (температура -60°C). Основные компоненты полученного продукта имели макромолекулярную структуру (полипептиды, полисахариды и т.д.). Наличие незначительного количества биомономеров (аминокислот, сахаров, оснований и т.д.) авторы объясняют последующим гидролизом ранее образовавшихся протобиополимеров [13].

Английский ученый Бернал (Bernal J.D.) предполагал, что ключевым моментом в образовании полимеров из небольших органических молекул была их адсорбция на глинистых минералах. Действительно, многие из глин весьма эффективно и избирательно адсорбируют аминокислоты, азотистые основания и сахара. Благодаря этому повышалась скорость образования полимеров биологического типа и локальная концентрация их на поверхности глин [3].

Важную, нередко определяющую роль в выполнении белковыми молекулами своих функций играет небелковая часть. В качестве примера можно назвать порфирины, основой структуры которых является порфириновое кольцо, состоящее из четырех пиррольных остатков, соединенных друг с другом углеродными мостиками. Порфирины были необходимы по крайней мере на двух этапах эволюции живых существ. Первый этап – возникновение порфиринзависимого фотосинтеза – относится к раннему периоду эволюции биосистем ($2 \cdot 10^9$ лет).

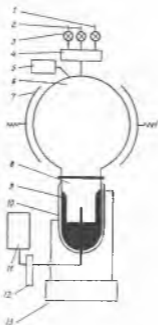


Рис. 18.4. *Схема установки для экспериментов с холодной плазмой [13]; 1-3 – игольчатые вентили для напуска компонентов газовой смеси; 4 – приемник компонентов смеси; 5 – манометр; 6 – сферическая часть реактора; 7 – внешние электроды; 8 – цилиндрическая часть реактора; 9 – лед; 10 – охлаждающая спиртовая рубашка; 11 – вакуумный агрегат; 12 – охлаждаемая ловушка; 13 – охлаждающая система*

Второй этап – возникновение порфириназависимого дыхания, сформировавшегося после того, как содержание кислорода в атмосфере достигло определенного уровня (не менее $6 \cdot 10^6$ лет назад) [11]. У современных организмов порфириновое кольцо входит в состав хлорофиллов (связанных в хлоропластах со специфическими белками), гемоглобинов, миоглобина, цитохромов, каталазы, пероксидазы. Неудивительно поэтому, что порфириновое кольцо достаточно легко образуется абиогенным путем из простых исходных молекул. На рис. 18.5 изображена схема его построения из формальдегида и пиррола.

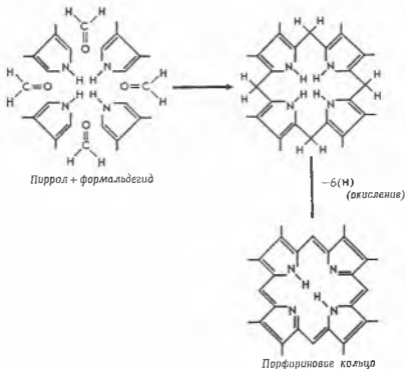


Рис. 18.5. Образование порфиринового кольца из формальдегида и пиррола

Четыре пиррольных кольца и четыре мостиковых атома углерода, входящие в состав альдегида, после отщепления воды дают порфириноподобный скелет. Чтобы получить собственно порфирин, необходима реакция, эквивалентная шести актам окисления [14].

В ряде модельных экспериментов, имитировавших условия, предположительно имевшие место на химическом этапе эволюции биосистем, был осуществлен синтез пентоз, пуринов и пиримидинов. Дальнейшие усилия исследователей были направлены на поиски условий, при которых из этих исходных малых молекул смогли бы образоваться отдельные нуклеотиды, а из них полинуклеотиды. Поскольку объединение всех названных малых молекул осуществляется по механизму дегидратационной конденсации, в модельных реакциях использовались неводные среды или такие конденсирующие агенты, как полифосфорные кислоты или их соли. Последние более

соответствуют условиям, которые, вероятно, существовали в предбиологический период на Земле. В качестве факторов, инициировавших образование нуклеозидов, нуклеотидов и полинуклеотидов, использовались ультрафиолетовое облучение, гамма-лучи, тепловое воздействие. Выход искусственно полученных продуктов с расположением связей, присущих их биологическим аналогам, был очень мал. У последних, как известно, азотистые основания соединены с первым атомом углерода пентозы N-гликозидной связью (пуриновые основания девятым атомом азота, пиримидиновые – первым), образуя нуклеозиды. Нуклеозид, будучи соединенным пятым атомом углерода пентозы эфирной связью с остатком фосфорной кислоты, образует нуклеотид. В молекуле нуклеиновой кислоты каждый нуклеотид соединен своим фосфатным остатком с третьим атомом углерода пентозы соседнего нуклеотида. Таким образом, каждый нуклеозид оказывается соединенным с двумя соседними нуклеозидами через фосфатные мостики третьим и пятым углеродными атомами своей пентозы. В отличие от этих природных (биологических) полинуклеотидов искусственно полученные полимеры часто содержали полифосфатные (пирофосфатные) мостики, а наличие дополнительного свободного гидроксила при втором углеродном атоме рибозы приводило к образованию неприродных 2'-2', 2'-5', 3'-3' межнуклеотидных связей, точек ветвления цепей и поперечных связей между последними. Тем не менее искусственные полимеры обнаруживали некоторые черты сходства с биогенными полинуклеотидами, в частности обладали определенной кодирующей способностью [11].

Возможность образования полисахаридов из моносахаридов проверяли в модельных экспериментах с воздействием гамма-излучения, ультрафиолетового света и повышенной температуры. Полисахаридами называют только те полимеры моносахаридов, которые имеют гликозидные связи. При действии гамма-излучения на водные растворы глюкозы в отсутствие кислорода образовывались различные по структуре полимеры, которые содержали множество нетипичных для полисахаридов C-C-связей. При этом происходило постепенное разрушение молекул глюкозы под действием OH-радикалов и гидратированных электронов.

Наиболее близкие к полисахаридам полимеры моносахаридов получали только в случае воздействия с температурой, лишь немногим превышающей точку плавления глюкозы (141–143°).

18.7. Формирование биохимического обмена веществ и протоклеток

Как показали результаты модельных экспериментов, в период химической эволюции на Земле помимо различных неорганических соединений имелись в тех или иных количествах представители практически всех известных классов органических соединений, которые возникли из сравнительно простых веществ под действием на них высокоэнергетических физических факторов. Путем конденсации микромолекул образовались макромолекулы (полипептиды, полинуклеотиды, полисахариды), которые впоследствии заняли основополагающие места в биосистемах.

Многообразие химических соединений, находящихся в водной среде, порождало еще большее многообразие бесконтрольно протекающих реакций, создавало химический хаос, в условиях которого невозможно было возникновение и формирование каких-либо систем, тем более таких сложных, как живые организмы. Для любой системы характерна определенная доля изоляции, отграниченности от внешней среды, тем не менее допускающая активное взаимодействие системы со средой. К числу таких фазообособленных открытых систем можно отнести пузырьки Голдейкра, коацерваты и микросферы Фокса.

Голдейкр описал образование в естественных условиях маленьких замкнутых пузырьков, заключенных в липоидно-белковую оболочку. Такие пузырьки возникают под влиянием ветра в результате изгибов пленок, обнаруженных на поверхности некоторых водоемов.

Фолсом (Folsome С.Е.) обратил внимание на то, что в экспериментах с электрической искрой, проходящей через смесь газов и достигающей поверхности воды, на последней выпадает органический материал в виде тонкой маслянистой пленки. При перемешивании или встряхивании последняя отделяется от поверхности и образует сферулы размером от 1 до 20 мкм в диаметре, а также более сложные структуры. Сферулы имеют тонкую гидрофобную мембрану, которая окружает другой мембраноподобный материал и часть водного раствора. Подобные органические структуры, по мнению Фолсома, очевидно являются результатом самосборки полимерного материала на поверхности воды. Завершив самосборку, они медленно оседают на дно. Показателен экспоненциальный характер нарастания числа микроструктур, что может свидетельствовать об автокаталитическом механизме их образования, когда одна структура служит центром для самосборки других. Это дало основание Фолсому сделать следую-

щий вывод: "Протоклетки образовывались в первобытных водоемах из полимерного вещества одновременно с образованием органических соединений. <...>. Протоклетки в большом количестве находились в водоемах с самого начала, образуясь при воздействии энергии на первичные газы и пленку. После образования они опускаются на дно водоема, где и оказываются защищенными от разрушительного действия сильного ультрафиолетового излучения" [19, с. 91].

При наличии в растворе высокомолекулярных веществ (даже в очень слабых, порядка 0,001% концентрациях) в нем легко осуществляется образование коацерватных капель. Коацерватная капля построена из коллоидного золья, в котором молекулы воды или другого растворителя в известной степени жестко ориентированы по отношению к частицам коллоида. Благодаря этому создается реальная граница между ними и свободными молекулами равновесной жидкости. Основное условие коацервации – взаимная ограниченная растворимость веществ. При этом происходит значительное концентрирование веществ в капле, которая отделяется от окружающего раствора четко выраженной поверхностью. В присутствии липоидов белковые коацерватные капли могут одеваться белково-липидной мембраной. Большой интерес представляют так называемые множественные комплексные коацерваты, в состав которых входит несколько разнообразных компонентов (нуклеиновые кислоты; полисахариды; белки, в том числе ферменты; неорганические соединения). С этой точки зрения, живую клетку можно рассматривать как очень сложный множественный коацерват: в один коацерват – цитоплазму – включен другой – ядро, а в него – образование коацерватной природы – ядрышко [3, 15].

Микросферы Фокса представляют собой плотные образования диаметром до 10 мкм, состоящие из белковоподобных соединений – протеиноидов, плохо растворимых в воде. Они могли синтезироваться при высоких температурах лавы вулканов. Каждая микросфера содержит около 10^{10} молекул протеиноида.

Бернал полагал, что полимеры биологического типа, образовавшиеся на поверхности глин, позднее самоорганизовались в протоклетки. Из них происходил естественный отбор тех, которые обладали синтетической и метаболической активностью [3].

Наиболее обоснованным как модельными экспериментами, так и теоретическими доводами является предположение о коацерватном происхождении протобионтов (протоклеток), которым присущи основные свойства биосистем – способность к обмену веществ с окружающей средой и к репродукции. В границах коацерватов происхо-

дили отбор биомолекул, формирование будущих субклеточных структур и механизмов их функционирования. Коацерваты различались между собой по химическому составу, избирательно поглощаемым из окружающей среды веществам и выделяемым в нее продуктам обмена. Между ними существовали типичные для современных организмов взаимоотношения, а также похожее на хищничество поглощение одного коацервата другим, которое завершалось их симбиозом и появлением множественного коацервата, лучше приспособленного к существованию. В коацерватах происходила совместная эволюция (коэволюция) различных соединений, в первую очередь пептидов и полинуклеотидов. В современных биосистемах нуклеиновые кислоты определяют первичную структуру белковых молекул, однако это не значит, что в процессе эволюции вначале возникли нуклеиновые кислоты, содержащие информацию об аминокислотной последовательности белков, необходимых для формирования биологических структур.

Абиотический синтез полиаминокислот давал неограниченную свободу для появления практически неповторимых по своей структуре молекул, что позволяло естественному отбору осуществлять селекцию из них наиболее активных и устойчивых, но, к сожалению, лишь единичных экземпляров. Отсутствовал механизм их массового тиражирования, закрепления во времени этой случайно возникшей индивидуальности.

А.И. Оларин в вопросе о происхождении клеток основное значение придавал образованию ферментов и формированию клеточных границ. Он считал, что первооснову жизни составляли белки, а генетическая система возникла позднее. Сходной точки зрения придерживается и Фокс. В эволюционной проблеме «курицы и яйца» – дилемме «ген сначала» или «белок сначала» – он отдает предпочтение последнему предположению. В качестве доводов в пользу концепции о первичности происхождения белков Фокс приводит следующие аргументы: простота их синтеза в абиотических условиях первобытной Земли; наличие каталитических свойств у искусственных олигопептидов; многофункциональность пептидов, позволяющая им в дальнейшем способствовать формированию различных структур и синтезу биомолекул, включая нуклеиновые кислоты; наличие у экспериментально полученных микросфер большого числа свойств, сходных с присущими живым системам (рост, почкование, пролиферация почкованием и делением, подвижность, образование контактов между собой и перенос микрочастиц из одной микросферы в другую, наличие граничного безлипидного двойного слоя и избирательная диф-

фузия веществ через него, осмотическая активность, ферментоподобная активность протеиноидов); наличие безматричного синтеза олигопептидов у современных организмов (бактерий). Безматричное тиражирование олигопептидов в вопросе об их первичности в эволюции представляется принципиально значимым, однако у современных организмов синтез, например, антибиотика грамицидина S осуществляется с участием ферментативного комплекса грамицидин-S-синтетазы, в активных центрах которой аминокислоты активируются энергией АТФ, а затем последовательно соединяются друг с другом [16]. Последовательность присоединения аминокислот определяется растущей олигопептидной цепью. Однако такой путь синтеза пептидов вряд ли мог стать универсальным, способным осуществлять тиражирование множества различных пептидов для последующей селекции в условиях формирующихся протобионтов.

Сторонники концепции «ген сначала» столкнулись, прежде всего, с серьезной трудностью стабильного воспроизведения в абиотических условиях нуклеотидов с присущим биосистемам расположением связей между основанием, остатком пентозы и фосфата, а также между нуклеотидами в нуклеиновой кислоте. Эти задачи наилучшим способом могли бы решить пептиды, обладающие каталитическими свойствами. Само же тиражирование полинуклеотидов достаточно просто осуществляется абиогенным путем, благодаря присущей им комплементарности. Вторая, не менее важная проблема, связана с возникновением на химическом этапе эволюции механизма реализации генетической информации, то есть «перевода» нуклеотидной последовательности полинуклеотида в аминокислотную последовательность полипептида.

Истина, как это нередко бывает в жизни, по-видимому лежит где-то в середине, между этими крайними концепциями. Логичнее всего предположить, что химическая, а затем и биологическая эволюция этих двух главных классов биомолекул шла параллельно, путем их взаимного приспособления (коэволюции). Только так из примитивного взаимодействия полинуклеотидов и полипептидов мог возникнуть четко отлаженный, регулируемый механизм биосинтеза белка в клетках современных организмов.

Уозз (Woese C.R., 1968) выдвинул гипотезу, согласно которой эволюция клетки началась с двух широко распространенных видов полимеров – полинуклеотидов, богатых пуринами, и полиаминокислот, которые состояли главным образом (если не исключительно) из основных аминокислот. Один из этих видов полимеров рассматривается в качестве катализатора, действующего особым образом при синтезе другого, и наоборот. В соответствии с этой гипотезой транс-

ляция начиналась в виде «прямого копирования». Кроме того, «трансляция» первоначально была обратимым процессом, а не односторонним, как в настоящее время. С предположением о прямом копировании «генетической» информации при трансляции согласуется феномен **эквиспиральности** вторичной структуры полипептидов и нуклеиновых кислот [25]. Сущность его состоит в следующем. Один виток α -спирали, которая является широко распространенной структурой белков, образован 3,6 аминокислотными остатками, которым на ДНК соответствуют $3,6 \cdot 3 = 10,8$ оснований. Известно, что на один виток вторичной структуры ДНК (хеликса) в В-форме приходится 10 п.н., а в А-форме, которую, как считают, ДНК принимает при транскрипции (в «рабочем» состоянии), — 11 п.н. Таким образом, число витков α -спирали полипептида практически совпадает с числом витков спирали ДНК, на которой закодирована аминокислотная последовательность этой α -спирали. Обе спирали правые. Не исключено, что необходимостью обеспечить взаимное стерическое соответствие этих спиралей в период дорибосомальной («прямой») трансляции и был обусловлен эволюционный выбор L-формы аминокислот, а не D-аминокислот, которые дают левую спираль. В дальнейшем этот примитивный механизм трансляции разделился на самостоятельный механизм транскрипции и современный аппарат трансляции, центральным звеном которого является рибосома.

Существенным доводом в пользу гипотезы Уозза служат эксперименты Бьернсона с сотр. по конденсации лизина в присутствии полиадениловой кислоты [18]. Они обратили свое внимание на ионные взаимодействия между основными полипептидами и полинуклеотидами. Эти взаимодействия играют важную роль в биологических системах, в частности при комплексировании гистонов и ДНК. Определенную роль они могли играть также в создании структуры рибосом, так как многие содержащиеся в них полипептиды являются основными. Кроме того, было известно, что полилизин проявляет ярко выраженную избирательность при взаимодействии с адениловой кислотой и полинуклеотидами с высоким содержанием аденина и тимина, а также то, что, как полагают, существовали предбиологические полинуклеотиды, обладающие каталитическими свойствами.

В своих опытах Бьернсон с сотр. проводили полимеризацию лизина с конденсирующим агентом (из класса карбодиимидов) в присутствии полиадениловой кислоты и без нее. Наиболее ярко выраженным эффектом присутствия полинуклеотида является увеличение образования дилизина в 3 раза. Это свидетельствует о том, что полиадениловая кислота катализирует конденсацию лизина.

Косвенно о возможной каталитической функции предбиологических полинуклеотидов свидетельствует то обстоятельство, что мно-

гие жизненно важные ферменты имеют небелковую часть нуклеотидного типа строения (никотинамидные коферменты – НАД, НАДФ; флавиновые простетические группы – ФМН, ФАД; нуклеозидтрифосфаты; нуклеозиддифосфатсахара; коэнзим А). Да и само объединение представителей полипептидов с нуклеотидами (и их производными) для более эффективного осуществления каталитической функции заставляет предположить, что одной из «точек соприкосновения» в прошлом полиаминокислот и полинуклеотидов могла быть присущая им способность (может быть взаимодополняющая) ускорять химические реакции.

Структура полинуклеотидов хорошо приспособлена для хранения и передачи информации, а каталитические возможности их ограничены. Полипептиды, состоящие из большого набора аминокислотных остатков с разнообразными реакционноспособными боковыми цепочками, напротив, идеально подходят для выполнения широкого круга структурных и функциональных задач. По этой причине в процессе эволюции произошла специализация полипептидов на выполнение взаимодополняющих функций и сформировались протоклетки, а затем и современные клетки.

С появлением нуклеиновых кислот как носителей генетической информации, способных, с одной стороны, осуществлять массовое тиражирование протоклеток с одинаковым обменом веществ, а с другой – спонтанно изменяться, открылись широкие возможности для замены ранее превалирующей химической эволюции биологической, опирающейся на «трех китов» теории Ч. Дарвина – изменчивость, наследственность, естественный отбор. Внешняя среда через механизм естественного отбора канализирует (направляет по определенному пути) процесс эволюции, выполняя своего рода управляющую функцию (управление – это, прежде всего, выбор из множества возможных вариантов оптимального, целесообразного), которую традиционно связывают с разумным субъектом. Наследственность закрепляет результат этого выбора, делая крайне маловероятное событие широко распространенным явлением.

Важным дополнением к полинуклеотидам и полипептидам явилось формирование универсального энергоносителя, объединившего в одной молекуле нуклеозид с моно-, ди- и трифосфатом. Типичным представителем такого вида молекул является аденозинтрифосфат (АТФ). Объединение в объеме клетки потока информации (нуклеиновые кислоты) и энергии (АТФ) с потоком вещества (аминокислоты) обеспечило надежное тиражирование клеток, их устойчивое существование и эволюционное развитие. Точками пересечения этих трех потоков в современной клетке являются ферменты, контролирующие трехсубстратную реакцию, – аминоксил-тРНК-синтазы. Они, как и все ферменты, обладают субстратной специфичностью, благодаря

которой соединяют аминокислоту (поток вещества) со «своей» тРНК (элемент информационной системы) макроэргической связью, заимствованной у АТФ (поток энергии). Полученный аминокислот-латферментный комплекс обладает свойствами, присущими всем трем потокам. Он содержит материал для будущей белковой молекулы, энергию для связывания между собой строительных блоков (аминокислот) и информацию, предопределяющую после взаимодействия с мРНК место конкретной аминокислоты в аминокислотной последовательности белковой молекулы [23].

В работах немецкого физико-химика, лауреата Нобелевской премии 1967 г. М. Эйгена (Eigen) подробно рассмотрены вопросы эволюции биологических макромолекул с позиций развиваемой им теории гиперцикла [27-29]. Австрийский ученый Г. Кастлер, в свою очередь, проанализировал проблему возникновения биологической организации с позиции теории информации [30].

18.8. От протоклеток – к современным клеткам

В литературе по вопросам возникновения жизни на Земле употребляются термины – пробионты, протобионты, протоклетки, предклетки и т.д., по-сути являющиеся синонимами, для которых, как правило, отсутствует четкое определение. Одну из формулировок для них дал Фолсом (Folsome С.Е.): «протобионт» – термин, принятый для обозначения промежуточного звена в процессе возникновения жизни, находящегося между эволюционирующими химическими соединениями, с одной стороны, и явно биологическими формами, имеющими генетический аппарат и подвергающимися дарвиновскому отбору, – с другой» [19, с. 84]. С ним полностью согласен академик А.М. Уголев [22, с. 221]. А.И. Опарин в качестве модели протоклеток предложил коацерватные капли, Фокс, Симионеску и Денеш – микросферы.

Наиболее конструктивный подход к анализу возможных путей перехода от протоклеток к элементарным живым системам – клеткам, предложил создатель концепции универсальных функциональных блоков А.М. Уголев [20, 21]. Он отмечает, что удивительное разнообразие живых систем сочетается с единством всех известных организмов на уровне строительных блоков, под которыми понимают такие простые органические молекулы, входящие в состав биомacroмолекул, как аминокислоты, моносахариды и т.д. Под функциональными блоками подразумеваются макромолекулы и макромолекулярные комплексы, выполняющие элементарные физиологические

функции. Основные функциональные блоки сформировались в первичной клетке, возникновение которой "явилось критическим моментом в эволюции жизни и тем рубежом, который разделил химическую эволюцию и биологическую" [22, с. 226].

Химический состав функциональных блоков зависит от имеющегося в окружающей среде набора строительных блоков, однако при их формировании в процессе эволюции используется, как правило, лишь небольшая часть этого набора. Так, на начальной стадии биогенеза существовало более 100 различных аминокислот, из которых живые системы отобрали лишь 20. Сходным образом обстояло дело с остальными строительными блоками макромолекул. По-видимому, они наилучшим образом обеспечивают слаженную работу связанных между собой функциональных блоков и определенную унификацию в расширяющемся разнообразии биосистем. В частности, эта унификация позволяет растительноядным животным питаться растениями и успешно включать их строительные блоки в свою метаболическую систему, в состав своих органов. Сочетание строительных блоков позволяет получить большое число возможных вариантов функциональных блоков, которое для полипептидов измеряется значениями, не встречающимися даже в астрономии. Так, для белковой молекулы, состоящей из 200 аминокислотных остатков, число вариантов их сочетаний равно $1,60694 \cdot 10^{260}$, а суммарная масса одинарного набора этих вариантов составляет $6,345 \cdot 10^{234}$ тонны. Для белковой молекулы, состоящей из 500 аминокислотных остатков, эти значения соответственно равны $3,2734217 \cdot 10^{650}$ и $3,2298 \cdot 10^{625}$ т (подробнее см. [23]). По сравнению с полученными значениями масса наблюдаемой Вселенной (около 10^{50} т) представляется невидимой пылинкой. Естественно возникает вопрос: все ли варианты сочетаний в процессе эволюции были подвержены естественному отбору, а если нет, то получается, что существующий живой мир, по-видимому, является одним из бесчисленного множества возможных и, скорее всего, не самым лучшим с позиции человеческого восприятия? В действительности так оно и есть, однако определенную долю удовлетворенности в наше сознание вносит стратегия формирования биосистем по принципу «от простого к сложному», которая позволяет естественному отбору осуществить сравнительно полную селекцию возможных вариантов и сформировать организмы из достаточно оптимально построенных функциональных блоков. Применительно к важнейшим макромолекулам – белкам – эта стратегия отбора реализуется следующим образом. На ранних стадиях формирования протоклеток происходил синтез олигопептидов, контролируемый случайным об-

разом синтезируемыми относительно небольшими полинуклеотидными молекулами. Причиной образования небольших пептидов и полинуклеотидов является сравнительно невысокая скорость их синтеза и наличие противоположно протекающего процесса – гидролиза, не позволяющего им достичь большого размера. Для образования каталитически активного пептида (протофермента) не требуется большое количество аминокислотных остатков. Если в какой-то протоклетке возникает протофермент, обладающий способностью ускорять одну из протекающих в ней реакций, то такая протоклетка начинает быстрее расти, чаще делиться и ускоренными темпами увеличивать численность своей популяции. Кроме того, субстрат оказывает защитное действие на образовавшийся протофермент, повышает время его жизни. Не исключено, что это относится и к активно функционирующему полинуклеотиду.

Таким образом, на раннем этапе формирования протоклеток происходил отбор наиболее эффективно работающих в их составе функциональных блоков – олигопептидов – из относительно небольшого (не астрономического) числа всех возможных сочетаний аминокислотных остатков (для олигопептида из 10 аминокислотных остатков число возможных вариантов равно $20^{10} = 1,024 \cdot 10^{13}$, что в весовом выражении представляет собой приблизительно 0,02 микрограмма). Из этого многообразия вариантов естественный отбор оставил лишь незначительную часть протоклеток с протоферментами, в наибольшей мере ускоряющими реакции, протекающие в них. Первичная структура такого протофермента кодировалась небольшим полинуклеотидом, представляющим собой одиночный ген – протоген, а весь протогеном состоял из набора одинаковых копий этого гена.

При слиянии протоклеток двух различных видов возникала гибридная протоклетка, в геном которой входили два разных одиночных гена. Если слияние протоклеток повышало жизнеспособность гибридной протоклетки, то численность ее популяции росла опережающими темпами, вытесняя менее приспособленные популяции.

Одиночные гены в протоклетке имели возможность химически связываться друг с другом фосфодизфирными связями (подобно нуклеотидам в полинуклеотиде), образуя объединенный ген, кодирующий один, но более крупный полипептид. Если последний обеспечивал протоклетке большие преимущества, чем два необъединившихся одиночных гена вместе взятых, то лидирующей, побеждающей в борьбе за существование, становилась популяция протоклеток, содержащих объединенный ген.

При простом делении протоклетки (митоз еще не существовал) в дочерние протоклетки стали переходить не только одиночные гены, но и объединенные, причем происходил преимущественный отбор протоклеток с гибридными генами, поскольку только они гарантированно передавали по наследству удачное сочетание двух одиночных генов.

В последующем происходило слияние уже исходных гибридных протоклеток, а вместе с ним – комбинирование и химическое связывание между собой объединенных ранее генов. В результате этого появились еще более крупные молекулы полипептидов, а естественный отбор лидирующих популяций происходил уже между новыми гибридами исходно гибридных протоклеток. В конечном счете появились протоклетки, которые содержали белки, состоящие из многих десятков и даже сотен аминокислотных остатков, и молекулы нуклеиновых кислот (группы сцепления генов), кодирующие первичную структуру целой совокупности белков.

В основе описанной модели естественного отбора пептидов, сопряженного с укрупнением молекул, лежит функциональный принцип. Поэтому полинуклеотиды и пептиды, которые принимали участие в комбинативном процессе формирования нуклеиновых кислот и белков, представляли собой функциональные блоки. В современных клетках роль генетических функциональных блоков играют хромосомы, а у белков, имеющих четвертичную структуру, – субъединицы.

Примечательно, что модель естественного отбора пептидов и полинуклеотидов имеет принципиальное сходство со схемой организации и проведения спортивных соревнований. Заключительному (финальному) соревнованию предшествуют отборочные состязания (районные, городские, зональные и т.д.), а затем 1/16-, 1/8-, четверть- и полуфинальные соревнования. Такой последовательный отбор победителя (лидера) исключает поочередное соревнование каждого участника со всеми остальными. Он ускоряет и облегчает процедуру выявления победителя, не снижая объективности получаемого результата (и соответствует классической схеме поиска нужной информации путем последовательного деления совокупностей пополам). В описанной эволюционной модели происходило «отборочное соревнование» между пептидами приблизительно одного размера за «право» участвовать в последующем создании более крупной молекулы.

Казалось бы, эту модель в настоящее время легко можно проверить. В банках данных имеется большой материал по первичной структуре белков, а компьютер быстро и точно осуществит поиск в них первичных функциональных блоков олигонуклеотидов. Однако

такой анализ **современных** белковых молекул, выполненный нами в 70-х и 90-х годах, ожидаемого результата не дал. Прежде всего, была показана высокая избирательность в парных сочетаниях аминокислотных остатков. Так, отношение фактической частоты встречаемости дипептидных фрагментов в исследованных белковых молекулах (несколько тысяч аминокислотных остатков) к теоретической, рассчитанной из предположения случайного равновероятного соединения аминокислот между собой (мы назвали это отношение коэффициентом сродства), изменялось от нуля (Три-Мет, Три-Фен и др., которые не были выявлены) до 3–5 (для Мет-Фен – 5,05). Встречаемость трипептидных фрагментов была на порядок, а тетрапептидных – примерно еще в 2 раза ниже. И это неудивительно. Условия существования современных одноклеточных организмов и особенно клеток многоклеточных организмов очень сильно отличаются от тех, в которых формировались пептидные функциональные блоки протоклеток. Мутации, сопровождавшие эволюцию, за прошедшие три-четыре миллиарда лет основательно «размыли» эти функциональные блоки.

Сложный путь эволюции совместно с белками и нуклеиновыми кислотами прошли и другие биомолекулы.

Белковые молекулы, занимающие среди биомолекул первое место по разнообразию строительных блоков (аминокислот), несут богатую структурную информацию. Последовательность аминокислотных остатков предопределяет вторичную и третичную структуры белковых молекул, а их взаимосвязь формирует четвертичную структуру белков и полиферментные комплексы. Путем взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами образуются структуры хромосом, рибосом, вирусов и др. Эти случаи формирования достаточно сложных структур без участия специальной информации, аналогичной закодированной на ДНК, привели ученых к мысли, что субклеточные структуры как в индивидуальном цикле клетки, так и в процессе ее эволюции образовались путем самосборки.

Все эти процессы становления вначале протоклетки, а затем клетки как кванта живой материи могли происходить только в условиях отграниченности от внешней среды. Роль такой избирательно изолирующей структуры, по мнению Фокса [11], выполняли белки, содержащие гидрофобные боковые цепи остатков лейцина, валина, фенилаланина и др. Современные мембраны пришли на смену белков с «липидными» свойствами позднее.

Первые живые организмы, как полагают [14], существовали уже более 3 млрд. лет назад. Они были представлены безъядерными клетками – протокариотами. Эукариотическая клетка появилась зна-

чительно позднее, примерно 2 млрд. лет назад. По строению, выполняемым функциям и потенциальным возможностям она неизмеримо сложнее прокариотической клетки. Эукариотическая клетка дала начало формированию на Земле многоклеточных организмов.

Существует предположение, что эукариотическая клетка появилась благодаря метаболическому симбиозу более простых организмов. Согласно теории клеточного симбиоза, выдвинутой и разработанной Маргулисом (Margulis L.), эукариотическая клетка представляет собой сложную структуру, которая состоит из клеток нескольких типов, живущих в симбиотических отношениях в пределах общей клеточной мембраны. По его мнению, корпускулярные органеллы эукариотических клеток имеют независимое происхождение и возникли как прокариотические клетки. Так, пластиды зеленых растений происходят из клеток симбиотических водорослей, способных к азробному фотосинтезу; митохондрии возникли из некой азробной бактерии [24]. Не исключено, что и остальные органеллы, включая аппарат деления клетки и ее ядро, имеют симбиотическое происхождение (рис.18.6).

Наряду с моделью Маргулиса существует теория, основывающаяся на происхождении эукариотической клетки путем последовательного усложнения в процессе эволюции прокариотической клетки, в результате которого возникли такие внутриклеточные структуры, как ядро, митохондрии, лизосомы, эндоплазматический ретикулум и др. Существенной тенденцией в развитии эукариотической клетки явилось многократное по сравнению с прокариотами увеличение объема генетической информации, проявившееся в появлении хромосомного набора. Это повышение мощности информационного потока потребовало формирования ядра, сложных механизмов репликации ДНК, транскрипции, трансляции и митоза, способного обеспечить четкое тиражирование генетически однородных клеток, крайне важное для многоклеточных организмов.

В основе работы всех внутриклеточных структур, а также в осуществлении межклеточных взаимодействий лежат молекулярные механизмы, которые в настоящее время успешно изучаются сравнительно молодой наукой – молекулярной биологией. Ей суждено сыграть важную роль в решении проблемы возникновения жизни на Земле, которое осуществлялось преимущественно на молекулярном и субклеточном уровнях.

Ретроспективные исследования периодов, удаленных от современности на миллиарды лет, основанные на зыбкой почве предпо-

ложений, порождают порою у ученых сомнение в возможности получения правильного ответа на поставленные вопросы.

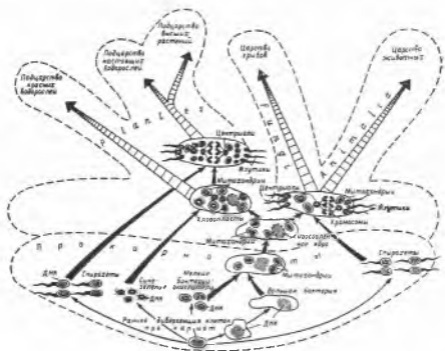


Рис. 18.6. Схема возможной последовательности этапов симбиогенетического происхождения клеток эукариотов, наложенная на родословное дерево клеточных (кариотов) (Воронцов, 1980. Цит. по [26])

На первых порах создается впечатление плутания в потемках, когда каждый автор пытается доказать, что его «потемки светлее». Однако все тайное, как правило, со временем становится явным. Пример тому – работы по проблеме возникновения жизни на Земле, связанные с именами крупнейших ученых всего мира. Модельные эксперименты, успехи в области космических полетов, астрономии и, что очень важно, в молекулярной биологии постепенно сужают зону неопределенности, делая более определенным ответ на вопрос: как возникла жизнь на нашей планете? Величайшим триумфом молекулярной биологии будет создание искусственным путем живых систем, о котором говорили Опарин, Энгельгардт, Симионеску, Дениш и другие ученые, занимавшиеся вопросами их естественного происхождения.

ГЛАВА ДЕВЯТНАДЦАТАЯ

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ЭВОЛЮЦИИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ И МЕХАНИЗМОВ ИХ РЕГУЛЯЦИИ

В предыдущей главе достаточно подробно изложены современные представления о возможности абиогенного образования в существовавших на Земле условиях многочисленных соединений, присутствующих современным организмам (аминокислот, пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеотидов), о возможности независимого параллельного синтеза полипептидов, полинуклеотидов, универсальных энергоносителей (полифосфатов и АТФ), а затем предшественников клеток (пробионтов, протоклеток) и одноклеточных организмов.

Есть предположение, что планета Земля (как часть космической материи) возникла 5 млрд. лет назад. В первичной атмосфере Земли преобладали H_2 , NH_3 , H_2O , CO_2 , CH_4 , из которых абиогенным путем поэтапно произошел синтез низкомолекулярных и полимерных органических соединений, а также предклеточных структур. На всех этапах имел место отбор молекул, структур и наиболее выгодных пробионтов, приведших 3,5 млрд. лет назад к появлению жизни, в процессе эволюции которой на Земле появилось огромное разнообразие ныне существующих организмов.

Самыми древними клеточными формами, которые встречаются в виде окаменелостей, являются бактерии и синезеленые водоросли – *прокариоты*, которые вероятно в течение 1,5 млрд. лет были единственным типом клеточных организмов на Земле. Клетки прокариот весьма разнообразны в биохимическом отношении. В частности, у бактерий можно обнаружить все основные метаболические пути, включая три главных процесса получения энергии – анаэробный, аэробный и фотосинтез. Затем появились *одноклеточные эукариоты* – простейшие, у которых возникли ядро и другие специализированные приспособления (хромосомы, эндоплазматический ретикулум, лизосомы, пероксисомы, множество различных внутренних мембран, цитоскелет, реснички, жгутики), а также развились способность к фагоцитозу, пиноцитозу, амебоидному движению, свойство раздражимости. Среди простейших заслуживает внимание хищное – *Didinium*, имеющее округлое тело, окаймленное двумя рядами ресничек, и одиночный выступ (рылообразный) на переднем крае. *Didinium* может плавать с помощью ресничек, преследуя добычу, парализовать (путем выпуска жал из рыльца) и поглощать жертву (другое простейшее) путем фагоцитоза. Возможно, именно эти свойства возникли очень рано у некоторых эукариот и обусловили (в процессе

эволюции) возможность захвата ими бактерий, которые позднее трансформировались в митохондрии и хлоропласты, о чем будет сказано ниже.

Многоклеточные эукариоты в филогенезе появились вследствие способности отдельных клеток к специализации своей структуры и функций, то есть к разделению обязанностей между различными типами клеток. Переход к многоклеточности произошел на нескольких уровнях: из клеток образовались ткани, из разных тканей – органы и системы, объединение которых дало целый организм. Самые примитивные многоклеточные (кишечнополостные) в своей организации достигли лишь тканевого уровня. У них, в частности у медузы, имеются лишь два слоя клеток (эктодерма и энтодерма), между которыми в слое неклеточного вещества (мезоглии) находятся нервные клетки, происходящие из эктодермы и формирующие нервную сеть по всему телу медузы. Последующая длительная эволюция многоклеточных привела к появлению растений, грибов, позвоночных животных.

Множественность, дифференциация и специализация структур и функций составляющих элементов многоклеточных организмов эволюционно способствовали возникновению у них разнообразных форм, механизмов и уровней межклеточных взаимодействий. Они необходимы для передачи веществ и энергии, а также для управления характером и интенсивностью обмена веществ и энергии.

Считается, что все организмы и все составляющие их клетки произошли эволюционным путем от одной предковой клетки. При этом имели место *случайные изменения* генетической информации, передаваемой от родителей к потомкам, и отбор генетической информации, способствующей выживанию и размножению организмов.

Очень важно, что современные организмы (в частности, входящие в их состав биологические молекулы и их превращения) содержат информацию о своих далеких предках, о сходстве и некоторых различиях между ними [4]. Некоторые же предковые бактерии, растения и животные сохранились как ископаемые.

Развитие представлений о многих закономерностях биологической эволюции на ранних этапах возникновения жизни и их влияние на последующую эволюцию живых организмов затруднено тем, что на Земле до сих пор не найдено останков и других следов пробионтов и других организмов, стоящих на границе химической и биологической эволюции. В связи с этим в настоящее время к решению задач теории эволюции все больше привлекаются те сведения, которые дает сравнительная биология ныне существующих организмов –

от одноклеточных до высших позвоночных. При этом используется обширный материал из различных областей биологии: морфологии, цитологии, генетики, биохимии, молекулярной биологии и др.

Во многих случаях система классификации живых организмов, основанная на анализе первичной структуры белков и ДНК, а также биохимических процессов и их регуляции, оказалась более совершенной, чем морфологическая классификация. Построение генеалогических последовательностей на биохимической основе также имеет ряд преимуществ перед морфологическими признаками [16], что привело к возникновению понятия биохимической эволюции. Молекулярная или биохимическая эволюция включает рассмотрение двух основных проблем – молекулярных основ филогенеза организмов и эволюции самих молекул [9].

Молекулы живых организмов в течение жизненного цикла должны обладать определенной устойчивостью (для поддержания структуры клеток, тканей, организма) и одновременно быть до некоторой степени неустойчивыми (например, распад глюкозы для трансформации химической энергии в работу, модификация структуры ферментов и сократительных элементов – при осуществлении функций и т.д.).

Эти же основные свойства биологических молекул (устойчивость и изменчивость) обусловили поступательный процесс эволюции различных форм биологической памяти: генетической, иммунологической и нейробиологической. Генетическая память, носителями которой являются нуклеиновые кислоты, передается поколениям (по наследству) и реализуется в процессе онтогенеза в соответствии с заложенной в генотипе информацией. Иммунологическая память включает элементы генетической памяти, но более сложная, появляющаяся в результате иммунного ответа на поступление в организм антигена; носителями иммунологической памяти являются Т- и В-клетки памяти. Нейробиологическая память еще более сложная, формируется в течение онтогенеза при участии нейронов. Нейробиологическая и иммунологическая формы памяти по наследству не передаются, передается лишь заложенная в генотипе способность к их формированию.

Эволюция жизни неразрывна от эволюции Земли, ее атмосферы, от процессов адаптации организмов к меняющимся условиям окружающей среды.

В ходе эволюционного развития организмы адаптировались к действию широкого (комплексного) спектра природных раздражителей: определенного барометрического давления и гравитации, уровню космического и теплового излучений, газовому составу окружающей атмосферы, смене сезонов – времени года (освещенность, тем-

пература, радиация, влажность и т.д.), биологических факторов (формирующихся биоценозов).

Процессы адаптации возникают и развиваются в живых системах на этапах выраженных (неадекватных) изменений окружающей среды, в условиях, исключающих возможность сохранения и поддержания нормальной жизнедеятельности без изменения организма в направлении, увеличивающем его шансы на выживание и размножение в этих условиях. Адаптация сопровождается биохимическими и физиологическими реакциями на клеточном, органном, системном и организменном уровнях, которые могут привести к повышению выживаемости и сохранению способности к размножению как отдельных индивидуумов, так и организмов целых популяций и видов.

Следовательно, при воздействии в филогенезе неадекватных факторов окружающей среды в организме происходят процессы активной адаптации, ведущие к восстановлению и поддержанию гомеостаза на новом уровне, более адекватном для конкретных условий, позволяющем организму существовать в измененной внешней среде. При этом возможны генетические изменения, повышающие адаптационные возможности организмов, подверженные естественному отбору и способствующие дальнейшей их эволюции.

Проблемы происхождения и эволюции жизни в значительной мере сводятся к проблемам происхождения, воспроизведения и эволюции нуклеиновых кислот, белков, в том числе ферментов, регуляции метаболизма, гомеостаза, адаптационных процессов.

19.1. Эволюция нуклеиновых кислот и белков

Проблемы происхождения и эволюции нуклеиновых кислот и белков (в том числе ферментов) тесно связаны между собой. Что появилось раньше – ферменты для синтеза нуклеиновых кислот или нуклеиновая кислота с информацией в ней о структуре белков-ферментов? Это старая проблема «курицы и яйца» на молекулярном уровне [5]. Одновременно возникают вопросы: какая нуклеиновая кислота появилась в филогенезе раньше (ДНК или РНК?), когда завершилось (и завершилось ли?) формирование генетического кода, рибосомного аппарата трансляции и т.д.

Имеющиеся факты свидетельствуют о том, что генетический код в основном одинаков и у очень примитивных, и у высокоразвитых организмов [4, 5]. Аналогично, у самых различных организмов, от бактерий и синезеленых водорослей до высших растений и человека, не обнаруживается никакого разнообразия в принципиальных механиз-

мах трансляции (нет систем трансляции, альтернативных рибосомному аппарату). При этом считается, что не существует никаких обоснований для воссоздания пути постепенного появления и эволюции имеющегося весьма сложного и совершенного рибосомного аппарата [2].

Все существующие модели эволюции генетического кода, приведшей к современному коду, а также белков-ферментов, необходимых для воспроизводства нуклеиновых кислот и реализации заложенной в них генетической информации, имеют весьма спекулятивный характер [6] и предполагают завершение (остановку) формирования кода уже в первых – примитивных – клетках, от которых произошли все современные живые системы.

М. Диксон и Э. Уэбб [5] считают более приемлемым предположение, что белки и нуклеиновые кислоты развивались бок о бок, с их частой взаимной трансляцией. Изменения в любом из этих соединений могли влиять на эволюцию каталитических свойств и таким образом указывать, благоприятна ли возникшая мутация.

Каталитической активностью могут обладать и свободные моно- и динуклеотиды, неорганические ионы, производные гема, пиридоксальфосфат и другие соединения, возможно эволюционировавшие параллельно с белками, а затем при случайной встрече соединились с ними, значительно усилили каталитическую активность ферментных белков.

Есть мнение, что, по-видимому, прародительницей всего живого на Земле была молекула РНК [7, 4]. О вероятности первоначального появления в процессе эволюции РНК могут свидетельствовать следующие факты:

- способность РНК выполнять функцию хранения закодированной в ней генетической информации и передачи ее в процессе репликации (сохранилась у РНК-содержащих вирусов);
- уникальная пространственная структура РНК определяет возможность и характер взаимодействия с другими молекулами (в том числе реакцию на внешние условия), что необходимо в качестве предпосылок для эволюционного процесса;
- необходимость короткой «затравки» РНК для репликации ДНК – как при непрерывном синтезе новой цепи ДНК, так и при синтезе ее фрагментами Оказаки;
- способность РНК передавать информацию полипептидам;
- участие в синтезе белка мРНК, тРНК, рРНК, без которых синтез белка в принципе возможен (на одной из цепей ДНК);

- открытие каталитической активности молекулы РНК, которой придается особое значение при рассмотрении проблем эволюции нуклеиновых кислот и белков;
- способность синтеза ДНК на молекуле РНК с участием обратной транскриптазы (ревертазы).

Каталитическая функция РНК обнаружена у некоторых ныне существующих растений и простейших. Некоторые из специализированных молекул РНК способны "разрезать" в определенной точке нуклеотидную последовательность в других молекулах РНК. В то же время выявлены типы молекул РНК, которые могут удалять часть своей собственной нуклеиновой последовательности и соединять концы оставшихся участков цепи (то есть способные к сплайсингу). Каталитическая активность РНК зависит от специфического расположения атомов на ее поверхности, которое приводит к повышению активности одного или нескольких нуклеотидов.

При возникновении жизни могла происходить и саморепликация РНК (без белков-ферментов), так как РНК способна выполнять функции и матрицы, и катализатора для саморепликации, то есть осуществлять все необходимые реакции для воспроизводства самой себя. Однако каталитические возможности молекул РНК (иногда называемых рибозимами), по-видимому, слишком ограничены, чтобы обеспечить все функции современной клетки. Вероятно поэтому в ходе дальнейшей эволюции каталитические функции от РНК перешли к молекулам белка, обладающим уникальной способностью катализировать практически любые реакции.

Появление ДНК, молекула которой более стабильна, чем молекула РНК, в процессе филогенеза возможно стало необходимым тогда, когда клетки сильно усложнились и для них потребовалось значительно больше генетической информации, чем та, которую могли стабильно поддерживать молекулы РНК. Между нуклеиновыми кислотами и белками произошло перераспределение функций, сохранившееся до настоящего времени: ДНК приняла на себя (в большинстве организмов) генетическую функцию, белки стали основными катализаторами, а РНК – главным образом промежуточным звеном между ними [4]. Причем РНК при синтезе белка сохранила за собой не только роль матрицы (мРНК), но и роль главного катализатора (рРНК, которая составляет более 60% массы рибосомы).

Большая стабильность молекулы ДНК обусловлена отсутствием гидроксильной группы у входящей в ее состав дезоксирибозы и двуцепочечной структурой, состоящей из двух комплементарных полинуклеотидных цепей. Эти особенности молекулы ДНК сообщают ей

большую устойчивость к гидролизу, относительно более легкую реплицируемость и большую способность к репарации повреждений, так как неповрежденная цепь ДНК может служить матрицей для восстановления дефектной цепи.

Говоря о консерватизме генетического кода и о том, что он в основном одинаков и у прокариот, и у высших эукариотов, заслуживает внимания возможность существования в одной и той же клетке эукариотов одновременно двух несколько различающихся кодов – в ядерной ДНК и в митохондриальной ДНК. В частности, в митохондриях человека имеются свои собственные ДНК, мРНК (копии с митохондриальных ДНК), рибосомы, свой аппарат белкового синтеза, РНК-полимераза, а также собственный генетический код, в котором 4 кодона сменили свой смысл: УГА отвечает триптофану, АУА – метионину, а кодоны АГА и АГГ стали терминирующими. У дрожжевых митохондрий последовательности ДНК (и белков) отличаются по коду и первичной структуре белков и от обычных ядерных, и от митохондриальных; у них все 4 лейциновых кодона, начинающихся с ЦУ, перешли к треонину, у которого стало 8 кодонов, а у лейцина осталось два (УАА и УУГ).

Существование двух кодов в одной клетке может свидетельствовать как об эволюции кода от более древнего прокариотического (митохондриального) до универсального современного (присущего в настоящее время всем живым организмам), так и о большей молодости кодов митохондрий (по сравнению с основными), которые могли возникнуть после перехода большей части митохондриальных генов в ядро [7].

Помимо митохондрий, внеядерные ДНК обнаружены и в хлоропластах.

Доля наследственных признаков, контролируемых внеядерными генами, очень мала по сравнению с наследственностью, определяемой ядром.

Обособленные генетические системы митохондрий и хлоропластов распространены чрезвычайно широко и находятся под совместным контролем ядерных и внеядерных геномов.

Обсуждение проблемы эволюции ДНК-содержащих клеточных органелл является чисто умозрительным. В настоящее время преобладают гипотезы о симбиотическом происхождении органелл. Они исходят из предположения, что первыми формами жизни были анаэробные прокариоты. С появлением фотосинтезирующих организмов (сходных с прокариотическими водорослями), в атмосферу стал поступать в большом количестве кислород, что в свою очередь способствовало

появлению у некоторых прокариотов аэробного дыхания. Эти свободнoживущие бактериеподобные аэробные организмы проникли в анаэробную прокариотическую клетку, уже прошедшую некоторый путь развития в сторону эукариотов (или были захвачены ею), и вступили с данной клеткой-хозяином в симбиотические взаимовыгодные отношения. Симбиотические клетки, приобретя способность к аэробному дыханию и, как следствие, к усилению синтеза АТФ, получили существенное преимущество перед другими организмами.

В течение последующей длительной эволюции происходило выпадение «избыточной» генетической информации из генома эндосимбионта, ряд метаболических функций которого перешел к хозяину, а эндосимбионт превратился в современную митохондрию (с сохранением части ДНК эндосимбионта).

Имеются некоторые доказательства в пользу данной гипотезы:

- митохондриальная ДНК, как и у современных бактерий, кольцевая и «голая», без белков хроматина (гистоновых и негистоновых – репрессорных и регуляторных);

- в митохондриях, как и у прокариот, имеется лишь одна РНК-полимераза, в то время как в ядре мРНК, тРНК и рРНК синтезируются разными РНК-полимеразами;

- митохондриальные рибосомы меньше цитоплазматических и сходны по размерам с бактериальными;

- движение митохондрий напоминает движение некоторых бактерий;

- белковый синтез в митохондриях, как и у бактерий, подавляется стрептомицином, а в цитоплазме – циклогексимидом, к которому митохондриальный и бактериальный синтез белка не чувствителен.

Вместе с тем митохондрии обнаруживают и ряд особенностей, более характерных для эукариотов и вирусов. В частности, мРНК митохондрий, в отличие от бактериальных, имеет высокое содержание поли-А (то есть более близкое к эукариотическим), а митохондриальная ДНК значительно меньше бактериальной и по своим размерам ближе к ДНК вируса или большой плазмиды.

Появление митохондрий в анаэробных эукариотических клетках было важнейшим шагом на пути эволюции, поскольку вместе с ними клетки получили эффективный источник энергии, который могли направлять на усложнение своих функций.

Симбиотические гипотезы допускают возможность появления и фотосинтезирующих организмов путем поглощения (захвата) какими-то протозукариотическими клетками фотосинтезирующих эндосимбионтов – потомков синезеленых водорослей. Об этом косвенно сви-

детельствуют некоторые черты сходства между хлоропластами и известными прокариотическими организмами, в частности рРНК хлоропластов с рРНК прокариот. Кроме того, предполагается, что формирование двигательной активности с помощью жгутиков произошло в результате симбиоза эукариотических клеток и спирохетоподобных жгутиковых бактерий. Двигательные структуры жгутиков, ресничек, а также большинства сперматозоидов позвоночных идентичны, что, вероятно, отражает общность их происхождения.

Одним из основных механизмов совершенствования организмов (на ранних стадиях филогенеза) было поглощение одноклеточных с аккумуляцией достоинств (способность к аэробному дыханию, фотосинтезу, двигательной активности), рассеянных между различными особями, обусловленное отсутствием иммунитета в этот период, то есть способности дифференцировать «свое» и «чужое» и отторгать «чужое» [16].

Возникновение фотосинтеза, использовавшего воду в качестве донора электронов, с выделением кислорода в среду, привело к образованию кислородной атмосферы Земли и к лавинному развитию аэробной жизни в ее нынешней форме, в том числе к появлению растительного царства и позвоночных животных.

Ключевым этапом эволюции позвоночных было развитие хорды — эволюционного предшественника позвоночного столба. На стадии эмбриогенеза хорду имеют все позвоночные, у взрослых она замещается позвоночным столбом. Внутри позвоночного столба заключен дорсальный трубчатый мозг, который на головном конце сильно расширяется и усложняется, образуя головной мозг, имеющий тенденцию к увеличению размера и сложности в процессе эволюции.

Увеличение числа извилин, за счет чего достигается дальнейшее увеличение общей площади коры мозга, получило наибольшее развитие у человека. Именно человек, один из видов позвоночных (*Homo sapiens*), в процессе эволюции приобрел способность к общественной организации, к управлению окружающей средой, к передаче накопленных знаний (в виде культуры) последующим поколениям. В настоящее время вмешательство человека в окружающую его среду начинает оказывать заметное воздействие на эволюцию больших групп живых существ (например, болезнетворных микроорганизмов, создание новых сортов растений, пород животных). Перспективен вопрос о возможности управления процессом эволюции. Но при этом необходимо понимание закономерностей естественной эволюции во избежание катастрофических последствий вмешательства человека в ее ход.

Не вызывает сомнений, что эволюционные изменения всегда начинаются с генетических, которые, изменяя ход развития, реализуются в фенотипе. При этом считается, что все ныне живущие организмы произошли от ранее существовавших путем длительного их изменения под воздействием внешних и внутренних факторов, и что эволюция определяется изменчивостью, наследственностью, естественным отбором организмов на основе перемен в экосистемах.

Сравнительный анализ структуры нуклеиновых кислот и белков (в том числе ферментов) у разных видов позволяет судить о сущности эволюционных изменений на молекулярном уровне. Чем больше генетических различий, вызванных мутациями, тем больше эволюционное расстояние между видами. Напротив, идентичность или сходство последовательности нуклеотидов в нуклеиновых кислотах, аминокислотной последовательности в белках свидетельствует о более тесной эволюционной связи видов.

Имеются данные о том, что для множества эволюционных преобразований требуется гораздо меньшее число мутаций, чем это полагали до недавнего времени, и что их фактическая частота намного выше, чем это нужно для эволюции. При этом физиологические и биохимические процессы изменяются в ходе эволюции значительно медленнее, чем морфологические [8]. Например, дивергентная эволюция, разделившая человека и шимпанзе 5 млн. лет назад (по молекулярным данным), привела к кардинальным отличиям в морфологии, поведении и интеллекте. Для таких отличий оказалось достаточным 1% различий в ДНК и белках человека и шимпанзе.

Мутировать в процессе эволюции могут как структурные, так и регуляторные гены. Однако палеонтологические, эмбриологические, генетические и молекулярно-биологические данные свидетельствуют о высокой вероятности примата в эволюции не структурных, а регуляторных генов; то есть эволюционная роль структурных генов, кодирующих белки, существенно меньшая по сравнению с регуляторными генами. В связи с тем, что большинство мутаций, вызывающих эволюционные преобразования в строении организмов, реализуются через аминокислотные замены, об эволюционной близости или отдаленности видов часто судят именно по изменениям аминокислотного состава различных белков. При этом надо иметь в виду, что каждый белок характеризуется своей особой скоростью эволюции, которая отражает влияние его мутаций на выживание организма и сохранение способности к размножению. Изменения в аминокислотной последовательности нарушают функцию у одних белков гораздо сильнее, чем у других. В гемоглобине вредными оказываются при-

мерно 6 из 7 случайных аминокислотных замен, в цитохроме С – 29 из каждых 30, в гистоне Н4 – почти все аминокислотные замены вредны. Возможно, что носители вредных мутаций элиминируются из популяции под действием естественного отбора.

У филогенетически древнего белка цитохрома С степень различий по аминокислотному составу хорошо согласуется с расстоянием, которое разделяет организмы на эволюционном древе. У человека и шимпанзе аминокислотная последовательность всех 104 остатков аминокислот в цитохроме С совершенно одинакова, у человека и лошади – различия по расположению 12 аминокислотных остатков, у человека и красной хлебной плесени – по 44. Следовательно, чем более отдалены филогенетически сопоставимые организмы, тем больше замен в полипептидных цепях цитохрома С. Однако пространственные структуры цитохрома С идентичны, что позволяет цитохромам любого вида растений, животных или эукариотических микроорганизмов реагировать (*in vitro*) с цитохромоксидазой, выделенной из эукариотов любого вида.

Расчеты предковой аминокислотной последовательности цитохрома С показали, что царства грибов, растений и животных возникли почти одновременно [9].

Подобно цитохромам С существуют другие группы (семейства) гомологичных белков, характеризующихся сходством аминокислотной последовательности, пространственной структуры, сущностью функциональных свойств (гистоны, глобины, иммуноглобулины, дегидрогеназы, пептидгидролазы и др.).

Наиболее консервативными в эволюции являются достаточно хорошо изученные структурные белки хромосом – нуклеосомные гистоны (Н2А, Н2В, Н3, Н4), которые имеются только в эукариотических клетках, составляя 50-60% массы хроматина. Из всех известных белков наибольшей эволюционной стабильностью отличаются Н3 и Н4, образующие внутреннюю часть нуклеосом. Например, аминокислотная последовательность Н4 за 1,5 млрд. лет после дивергенции предкового гена изменилась лишь на два аминокислотных остатка (из 102). Так, за этот период времени у гороха в пептидной цепи Н4 по сравнению с Н4 коровы произошла замена остатка валина на изолейцин (обе аминокислоты являются гидрофобными, неполярными) и остатка лизина – на аргинин (обе аминокислоты гидрофильные, положительно заряженные). Н3 гороха и коровы различаются по 4 аминокислотным остаткам (из 135). Такая эволюционная стабильность предполагает, что почти каждая аминокислота, входящая в со-

став этих белков, играет важную роль, и изменение в любом положении может оказаться вредным для клетки.

Эволюционно менее стабилен (то есть более вариабилен по аминокислотному составу) гистон H1 (в его составе 215 аминокислотных остатков), находящийся на поверхности нуклеосом, помогая их соединению друг с другом. При связывании H1 с ДНК к ней присоединяется сразу по 8 и более белковых молекул. При воздействии на H1 белков-регуляторов происходит локальная деконденсация хроматина (отщепление белков от ДНК), что способствует активации генов. «Активный хроматин» обладает необычайно низкой способностью связывать H1 [4]. Из эукариотов H1 не выявлен у дрожжей, и, по-видимому, поэтому у них весь хроматин находится в активном состоянии. Насекомые (например, дрозофилы) имеют геномы больших размеров, чем у дрожжей, и содержат H1.

В эритроцитах птиц, имеющих ядро, обнаружен H5, имеющий некоторое сходства с H1, но блокирующий пролиферацию клеток, возможно, за счет прочной связи с хроматином, в связи с чем не происходит его активация. Гистон, аналогичный H5, обнаружен в нейронах, которые так же, как и эритроциты птиц, будучи ядерными клетками, не пролиферируют.

Для эволюции новых белков очень большое значение имеют дубликации ДНК, в чем можно убедиться на примере особенно хорошо изученного семейства глобиновых генов. Эти гены кодируют полипептидные цепи размером около 150 аминокислотных остатков, которые в комплексе с гемом (гемоглобиновые белки) могут более эффективно поддерживать уровень кислорода в тканях по сравнению с его простой диффузией.

К семейству гемоглобиновых белков относят гемоглобины дрожжей, многих морских червей, насекомых, примитивных рыб, в состав которых входит одна полипептидная цепь; а у высших позвоночных в состав молекулы гемоглобина входят два типа глобиновых цепей – α и β . К этому же семейству относят леггемоглобин, входящий в состав симбионтов бобовых растений с клубеньковыми бактериями. По-видимому, в ходе эволюции высших рыб (около 500 млн. лет назад) произошла серия мутаций и дубликаций соответствующего гена, в результате чего образовались два слегка отличающихся друг от друга гена, кодирующих α - и β -цепи глобинов. У высших позвоночных в настоящее время молекула гемоглобина у взрослых животных состоит из двух α - и двух β -цепей ($HbA-\alpha_2\beta_2$), кооперативное взаимодействие которых обеспечивает более эффективное связывание и освобождение кислорода («гем-гем взаимодействие»). У лягушки *Xenopus*

α - и β -глобиновые гены лежат рядом в одной хромосоме, а у птиц и млекопитающих кластеры α - и β -глобиновых генов находятся в разных хромосомах, что свидетельствует о разъединении двух генов в результате транслокации примерно 300 млн. лет назад [4]. Хромосомные участки, кодирующие цепи глобина у человека, орангутана и шимпанзе, сохранились практически в неизмененном виде в течение последних 5-10 млн. лет, то есть с тех пор, как эти виды дивергировали. В частности β -цепь гемоглобина человека и других приматов отличается лишь по одному аминокислотному остатку, в то время как у человека и ехидны – по 31 позиции (из 146).

В ходе эволюции млекопитающих мутации и дубликации, по-видимому, подвергается ген β -цепи, вследствие чего возник новый тип гемоглобина (HbF- $\alpha_2\gamma_2$), синтезируемый только в эмбрионе.

В свою очередь вновь появившийся ген также подвергся последовательным мутациям и дубликациям – возник HbE ($\alpha_2\varepsilon_2$), а дубликация гена β -цепи у взрослых приматов привела к образованию гена минорной формы – δ -глобина (HbA₂- $\alpha_2\delta_2$).

У человека HbE синтезируется в желточном мешке 5-12-недельного эмбриона, HbF – в печени плода до его рождения и часть – после рождения, HbA – часть до рождения и до 100% после рождения – в костном мозге, HbA₂ (минорный) – после рождения – в костном мозге.

HbE и HbF обладают повышенным сродством к кислороду по сравнению с HbA, что способствует переносу кислорода от материнского HbA через плаценту к HbE или HbF плода.

Повышенным сродством к кислороду обладают также одноцепочечные глобиновые белки дрожжей и мышц позвоночных (миоглобин). Наиболее богаты миоглобином красные мышцы, особенно морских млекопитающих, в которых он выполняет роль депо кислорода. Леггемоглобин растений имеет мономерную структуру, близкую к миоглобинами.

Появление гемоглобиноподобных мономерных молекул в ходе эволюции, по-видимому, способствовало увеличению размеров многоклеточных животных вследствие повышения поступления (связывания с гемоглобином) кислорода в ткани. При этом с усложнением тканевой организации в ходе эволюции возникает и постепенно возрастает градиент тканевой диффузии кислорода.

Соединение α - и β -, α - и γ -, α - и ε -, α - и δ -цепей в тетрамеры ($\alpha_2\beta_2$ и др.) является новым этапом эволюции, приводит к появлению у гемоглобина новых свойств, дающих организму позвоночных функциональные преимущества. Гемоглобины приобретают функцию внекле-

точного переносчика кислорода. Одновременно происходит постепенное понижение сродства гемоглобина к кислороду. Это облегчает передачу кислорода из крови в ткани, передачу кислорода на миоглобин мышц, у которого сохраняются функции резервного источника кислорода и внутриклеточного переносчика кислорода от гемоглобина к митохондриям, а также, как указано выше, передачу кислорода от гемоглобина крови в организм плода.

Как правило, для членов одного семейства гомологичных белков характерно определенное сходство аминокислотной последовательности, пространственной структуры, общность функциональных свойств. Однако известны случаи, когда имеющие одного предка молекулы, родственные по аминокислотной последовательности и по пространственной структуре, в ходе эволюции претерпели значительные функциональные изменения (например, лизоцим и лактальбумин). И, напротив, не обнаруживается гомологии в аминокислотной последовательности у сериновых пептидгидролаз животных (трипсин, химотрипсин) и бактериального субтилизина.

Как известно (глава 8), пептидгидролазы обладают как групповой (гидролиз пептидных связей) специфичностью, так и индивидуальной (гидролиз пептидной связи рядом с радикалом определенной аминокислоты). Групповая специфичность пептидгидролаз обусловлена преимущественно структурой каталитического участка, а индивидуальная – структурой субстрат (радикал) связывающего участка активного центра.

В организме человека и животных, а также у растений и микроорганизмов эволюционно возникли 4 основных группы пептидгидролаз, имеющих различные типы механизмов протеолиза: «кислые протеиназы», цинксодержащие, тиоловые и сериновые пептидгидролазы.

Кислые протеиназы имеют оптимум pH ниже 5 вследствие участия в каталитическом акте кислых аминокислотных остатков. К ним относятся пепсин желудочного сока, в активном центре которого содержатся два остатка аспарагиновой кислоты, один из которых должен быть в ионизированной, другой – в неионизированной форме. По структуре и ферментативным свойствам сходны с пепсином лизосомные кислые протеиназы, осуществляющие внутриклеточное расщепление белков, а также кислые протеиназы из различных плесневых грибов.

Представителями *цинксодержащих пептидгидролаз* являются карбоксипептидазы А и В, аминокислотпептидазы цитозоля и микросом. В частности, наличие в активном центре карбоксипептидазы А цинка и

отрицательного заряда Глу₂₇₀ индуцирует такое смещение электронов на субстрате, которое повышает скорость катализа.

Сериновые пептидгидролазы распространены наиболее широко (трипсин, химотрипсин, эластаза поджелудочной железы, тромбин, плазмин и другие факторы свертывающей и антисвертывающей системы крови позвоночных, бактериальный субтилизин). Нуклеофильную атаку в сериновых пептидгидролазах осуществляет гидроксил серина, активируемый гистидином, на который, в свою очередь, оказывает влияние ионизированный аспартат.

В тиоловых пептидгидролазах (папаине и хемопапаине из млечного сока дынного дерева, катепсине В – внутриклеточном ферменте позвоночных, стрептококковой протеиназе) в активном центре имеется цистеин, SH-группа которого (активируемая гистидином) аналогична роли активированного гидроксила серина в сериновых пептидгидролазах.

Наиболее изучена структура, ее эволюция и специфичность сериновых пептидгидролаз. Исследования показали, что ферменты поджелудочной железы (трипсин, химотрипсин и эластаза) возникли из общего предшественника, о чем свидетельствует то, что у них идентична последовательность около 40% аминокислот, которая во внутренней части молекул еще выше, в активном центре последовательность аминокислот, окружающих серин, одинакова (Гли-Асп-Сер-Гли-Гли-Про). У сериновых пептидгидролаз имеется большое сходство третичной структуры, в том числе системы переноса заряда, состоящей, в частности, у химотрипсина из остатков Асп₁₀₂, Гис₅₇ и Сер₁₉₅, соединенных между собой водородными связями. Такая система переноса заряда (Асп...Гис...Сер), имеющаяся в трипсине, химотрипсине, эластазе, тромбине, плазмине, субтилизине, играет ключевую роль в катализе благодаря способности связывать протон. Отрицательно заряженный Асп₁₀₂ (R-COO⁻) поляризует в химотрипсине имидазольную группу Гис₅₇, что повышает его способность осуществлять передачу протона от гидроксила Сер₁₉₅ к Асп₁₀₂, в результате чего Сер₁₉₅ приобретает необычайно высокую реакционную способность. При этом происходит нуклеофильная атака субстрата кислородом серина, ослабление и разрыв пептидной связи в субстрате, с присоединением элементов воды к продуктам реакции.

Однако у субтилизина (пептидгидролазы некоторых микроорганизмов) последовательность аминокислот и третичная структура совершенно различны по сравнению с пептидгидролазами поджелудочной железы. Так, например, в химотрипсине имеется 5 дисульфидных мостиков, в субтилизине – ни одного; последовательность

аминокислот, окружающих серин в активном центре субтилизина (Гли-Тре-Сер-Мет-Ала-Сер), не имеет ничего общего с таковой химотрипсина. Это указывает на их независимое появление в процессе эволюции, но пространственное расположение групп, из которых формируется активный центр субтилизина (система переноса заряда – Асп...Гис...Сер), является почти точной копией того, что характерно для активного центра других сериновых пептидгидролаз. Следовательно, в белках, в том числе в ферментах, имеющих различных предшественников, могут возникать локальные аналоги в пространственном расположении определенных остатков аминокислот, что приводит к сходству между ними в отношении структуры активных центров и функций.

Таким образом, сериновые пептидгидролазы, даже имея различное эволюционное происхождение, осуществляют гидролиз пептидной связи по единому механизму. В то же время пептидгидролазы, даже имеющие общее происхождение (от одного предшественника) и единый механизм катализа, различаются субстратной специфичностью, то есть осуществляют гидролиз пептидной связи лишь по соседству с радикалами определенных аминокислот. Эта индивидуальная для каждого фермента специфичность связана со структурой субстратсвязывающего участка, расположенного в активном центре рядом с каталитически активными группировками. В частности, в сериновых пептидгидролазах субстратсвязывающие участки («карманы») расположены в активном центре рядом с серином, входящим в состав системы переноса заряда (рис.19.1). В химотрипсине внутренняя поверхность «кармана» образована неполярными аминокислотами. Размеры и неполярность «кармана» химотрипсина обуславливают возможность размещения в нем радикалов ароматических аминокислот, или больших неполярных боковых цепей других аминокислот, и гидролиз пептидных связей рядом с ними. В «кармане» трипсина, гидролизующего пептидную связь рядом с лизином или аргинином, имеется остаток аспарагиновой кислоты, которая образует прочную электростатическую связь с лизином или аргинином. В «кармане» эластазы аминокислотные остатки валина и треонина как бы закрывают входение в глубину «кармана» больших боковых цепей аминокислот, оставляя доступ лишь для небольших незаряженных боковых групп аминокислот, рядом с которыми и происходит гидролиз пептидной связи.

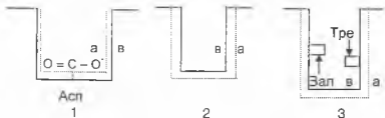


Рис. 19.1. Схемы радикалсвязывающих «карманов» в сериновых пептидгидролазах: 1 – трипсина, 2 – химотрипсина, 3 – эластазы; а – полярная поверхность «кармана», в – неполярная поверхность «кармана»

Гены, кодирующие новые белки, в филогенезе могут образовываться при рекомбинации экзонов – кодирующих последовательностей ДНК, разделенных интронами. Открытию данного механизма эволюции генов способствовало выявление роли дубликаций ДНК не только в образовании больших генных семейств, но и в возникновении новых одиночных генов. Белки, кодируемые такими генами, можно узнать по присутствию повторяющихся сходных белковых доменов, которые последовательно ковалентно связаны друг с другом. Генами, возникшими в результате многократных дубликаций исходной последовательности ДНК, кодируются иммуноглобулины, альбумины, большинство фибриллярных белков (коллагены, спектрины). Например, в гене овальбумина 7 экзонов и 6 интронов, причем суммарная длина интронов составляет в нем 85% общей длины ДНК гена. В гене коллагена обнаружено свыше 50 интронов.

Интроны разделяют гены на отдельные участки («мини-гены»), которые могут рекомбинироваться в ходе эволюции вида с образованием новых генов.

Особенно много «мини-генов», являющихся экзонами, в процессе эволюции образовалось у генов, кодирующих иммуноглобулины. Продуцируемые лимфоцитами специфические иммуноглобулины, состоящие из легких и тяжелых полипептидных цепей, близких по структуре к современным иммуноглобулинам класса М, впервые появляются (в ответ на антиген) у круглоротых позвоночных. У костных рыб константные домены легких цепей дивергируют на каппа- и лямбда-типы. IgM обнаружен у всех позвоночных, однако у рыб круг распознаваемых антигенов весьма узок; он более широкий у амфибий и практически неограничен у птиц и млекопитающих.

У птиц и млекопитающих изменение среды обитания, температуры тела, развитие систем регуляции и других систем потребовало новых, более действенных иммунных систем регуляции, в том числе вызвало дивергенцию доменов антител и в связи с этим расширение их классов (у птиц – до 3, у млекопитающих – до 5) и подклассов (у млекопитающих – до 9).

В процессе эволюции таким путем возникло суперсемейство иммуноглобулиноподобных генов, в которое входят гены, кодирующие различные белковые молекулы, принимающие участие в иммунологическом распознавании и регуляции генетического гомеостаза в организме в процессе его индивидуального развития (иммуноглобулины, Т-клеточные рецепторы, антигены главного комплекса гистосовместимости, β -микроглобулин и др.). Эволюцией создан уникальный механизм формирования генов, кодирующих полипептидные цепи антител (иммуноглобулинов) и Т-рецепторов.

В незрелых (недифференцированных) лимфоцитах нет генов, с которых могла бы сниматься информация о структуре легких (L-) и тяжелых (H-) цепей различных антител, α - и β - цепей Т-клеточных рецепторов. В таких лимфоцитах имеются лишь сегменты («мини-гены») будущих генов, разбросанные и отделенные друг от друга иногда тысячами пар нуклеотидов (интронами). При созревании лимфоцитов происходит сближение и объединение в один ген разных сегментов, несущих информацию о переменных доменах L- и H-цепей иммуноглобулинов, α - и β -цепей рецепторов Т-лимфоцитов (у человека около 400), которые принимают участие в формировании антигенсвязывающих центров антител и Т-клеточных рецепторов.

Случайное комбинационное разнообразие, возникающее при сборке «мини-генов», дает возможность появления в ДНК зрелых лимфоцитов огромного количества специфических переменных областей генов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов, несущих информацию о миллионах антигенсвязывающих участков антител и рецепторов Т-клеток, что обеспечивает их чрезвычайное разнообразие.

Эволюционное разнообразие белков главного комплекса гистосовместимости, входящих в суперсемейство иммуноглобулинов, достигается другим способом. Гены молекул всех классов главного комплекса гистосовместимости заключены в единичные кластеры, то есть гены организованы без разрывов. Изменчивость этих генов могла возникнуть путем точечных мутаций, рекомбинаций, кроссинговера и конверсии их.

Существует мнение, что уникальный процесс генерации разнообразных антигенраспознающих молекул понадобился для того, чтобы млекопитающие и птицы сумели выжить под инфекционным давлением разнообразных земных микроорганизмов, эволюционирующих чрезвычайно быстро (в считанные дни, недели) по сравнению с медленно эволюционирующими животными. Запрограммированная изменчивость антигенсвязывающих молекул суперсемейства иммуноглобулинов в количественном отношении в какой-то мере сопоставима с разнообразием микроорганизмов [30]. Ставший в основе запрограммированно-случайным, механизм генерации разнообразия соответствующих генов (при рекомбинации ДНК) объясняет в какой-то мере способность иммунной системы «в лице» лимфоцитов распознавать не только инфекционные микроорганизмы, но и другие биологические агенты, несущие генетически чужеродную информацию (некоторые токсины, аллергены, антигены мутировавших, опухолевых, трансплантированных, половых и других клеток).

Эволюция геномов ускоряется транспозирующимися (подвижными) элементами (транспозонами). Долгое время считалось, что генетический аппарат клетки неподвижен, фиксирован и все гены в нем занимают определенное положение.

В конце 40-х годов XX в. американка Б. Макклиток получила на кукурузе ряд мутаций, которые она объяснила (на основе косвенных данных) наличием генетических элементов, меняющих свое место. В 60-70-е гг. подвижные генетические элементы были обнаружены у бактерий (цит. по [10]).

В 1976-1977 гг. в лаборатории Г.П. Георгиева Ю.В. Ильин, Е.В. Ананьев и Н.А. Чуриков впервые открыли мобильные диспергированные гены (МДГ) животных клеток (в геноме плодовой мушки дрозофилы), осуществили их клонирование и описали свойства полученных МДГ [10]. Вскоре Ф.Крик предположил, что подвижные элементы генома являются «эгоистической ДНК», не выполняющей полезных для клетки функций, но и не приносящей, как правило, заметного вреда клетке и не приводящей поэтому к выбраковке особей с мобильными генами в ходе естественного отбора. Впоследствии выяснилось, что как у прокариот, так и у эукариот имеется несколько типов транспозонов, каждый из которых представляет собой автономную единицу, кодирующую белки, необходимые для транспозиции, в процессе которой происходит узнавание концов транспозирующихся элементов. Некоторые транспозоны содержат промоторы, в которых может быть инициация транскрипции и активация смежных с транспозоном генов.

У бактерий самые короткие транспозоны (Is-элементы), состоящие из 768-1428 пар оснований, кодируют только белки, участвующие в транспозиции. Более крупные транспозоны (обозначаемые как Tn – из 2500-9300 пар нуклеотидов) несут дополнительные генетические маркеры, например лекарственной устойчивости [11]. При транспозиции донорный участок бактериальной ДНК не теряет транспозон, а реципиентный приобретает его копию.

В геноме всех видов эукариотов – от дрожжей до человека – имеются как крупные транспозоны – МДГ, с общей длиной в 5-10 тысяч пар нуклеотидов, так и короткие – длиной 100-200 пар нуклеотидов.

Важнейшим признаком подвижности элемента генома (транспозона) является наличие на обоих его концах коротких одинаковых отрезков (повторов) из 4-5 нуклеотидных звеньев, рядом с которыми происходит «вырезание» транспозона. При участии концевых нуклеотидов транспозоны встраиваются в новые (реципиентные) участки ДНК.

На долю транспозонов приходится 10-20% геномной ДНК высших эукариот [10,4]. Подвижные элементы, обладая способностью размножаться независимо от клеточного цикла и внедряться в новые места генома, являются мощным источником изменчивости генетического аппарата, которая в свою очередь создает материал для естественного отбора и вносит существенный вклад в эволюцию. Изменения генетического аппарата возможны путем мутации гена, в который встраивается транспозон, усиления или уменьшения его активности, а также путем активации соседних неактивных генов, в том числе онкогенов. Кроме того, возможен перенос отдельных экзонов и регуляторных последовательностей в новые участки ДНК, если по обе их стороны встраиваются транспозоны, узнаваемые одним и тем же специфическим ферментом – транспозазой. Таким образом, возможно перемещение участка ДНК, расположенного между двумя транспозонами, что может способствовать образованию новых структурных или регуляторных генов.

За счет мутаций и перестройки генов, вызываемых транспозонами, происходит больше половины спонтанных мутаций у дрозофилы [4], а по некоторым оценкам, с внедрением подвижных элементов генома связано до 90% всех мутаций [10].

Свой вклад в изменчивость генома и создание разнообразия организмов для естественного отбора в процессе эволюции вносят и ретровирусы, имеющие исключительное сродство с МДГ. Ретровирусы в качестве генома содержат РНК, связанную с обратной транскриптазой, катализирующей синтез ДНК на РНК (в качестве матрицы) в зараженной вирусом клетке. Эта ДНК, как и МДГ, имеет длинные (с промотором) и

короткие концевые повторы, может внедряться в геном клетки-хозяина, перемещаться в нем, вызывать различные генетические изменения и тем самым участвовать в эволюционном процессе.

Транспозоны отличаются от обычных мутагенов способностью длительное время находиться в хромосоме в состоянии покоя и время от времени бурно активироваться, с почти одновременным перемещением транспозонов нескольких типов. Если такие взрывы происходят в половых клетках, то они вызывают множественные изменения в геноме потомства, с появлением особей, отличающихся от родителей сразу по большому числу генов и признаков, что может иметь большое значение в эволюции и видообразовании.

Последствия множественных изменений в геноме при участии транспозонов, в том числе вирусного происхождения, могут быть различными. В некоторых случаях транспозоны способны действовать как полезные симбионты, способствуя выживанию тех видов, в геноме которых они содержатся, в других случаях возможны отрицательные последствия. В частности, мобильные гены, включая ретровирусные, могут внедряться в ДНК по соседству с протоонкогенами, активировать их и тем самым индуцировать возникновение опухолевых клеток.

19.2. Эволюция метаболических процессов и механизмов их регуляции

Как сказано выше, все ныне живущие организмы произошли, вероятно, из одной единственной первобытной клетки, возникшей несколько миллиардов лет назад и пережившей своих конкурентов. В результате деления клеток, их мутаций и естественного отбора возникали многие типы прокариотических одноклеточных организмов, в ходе эволюции адаптировавшихся к различным условиям окружающей среды (в почве, болотах, океанах, при различных температурах, барометрическом давлении, концентрации солей и т.д.). При этом в клетках появились цепи ферментативных реакций, продукты одних из них служили субстратом для следующих реакций.

В начале зарождения жизни на Земле клетки могли жить и расти, питаясь окружающими их молекулами – продуктами абиотического синтеза. По мере истощения запасов пребиотических органических веществ преимущество при естественном отборе получали те организмы, которые приобрели способность вырабатывать ферменты для синтеза необходимых органических веществ непосредственно в

клетке. Таким образом, постепенно увеличивался набор ферментов в клетке и, соответственно, возникали новые метаболические пути.

Даже некоторые из современных одноклеточных прокариот способны синтезировать все необходимые им вещества из нескольких простых соединений и используют в качестве питательных веществ любые органические молекулы (сахара, аминокислоты, жиры, полисахариды, полипептиды и др.). Существуют виды бактерий (цианобактерии), которые могут получать атомы кислорода из CO_2 , атомы азота из N_2 и существовать только за счет воды, воздуха и солнечного света, обогащая при этом атмосферу кислородом и создавая условия для возникновения аэробных процессов. Но для превращения CO_2 и N_2 в доступную для усвоения форму (например, CO_2 в моносахариды) потребовалось в ходе эволюции возникновение фотосинтеза, в процессе которого энергия солнечного излучения используется для превращения CO_2 и N_2 в органические соединения. Несмотря на относительно простое строение, бактерии способны быстро размножаться (путем деления) и легко адаптируются к изменениям внешней среды благодаря спонтанным мутациям и естественному отбору.

Появление прокариот, способных синтезировать органические компоненты клетки из неорганических, создало условия для развития более сложных типов организмов, получивших возможность существовать за счет использования (в качестве пищи) первичных продуцентов и продуктов их жизнедеятельности.

С возникновением фотосинтеза земная атмосфера превратилась в смесь газов, в которой содержание кислорода достигло 21%. В ходе дальнейшей эволюции живые существа с помощью кислорода приобрели способность более полно окислять молекулы пищи и получать при этом значительно больше энергии из одного и того же количества органического вещества. В настоящее время аэробное окисление (дыхание), используемое для синтеза АТФ, характерно для подавляющего большинства организмов, включая и большинство прокариот.

Таким образом, прокариотические клетки, более близкие в общих чертах с самыми ранними клетками-прародительницами, в биохимическом отношении весьма разнообразны. В частности, у различных бактерий обнаруживаются все основные метаболические пути процессов ассимиляции и диссимиляции, включая три главных процесса получения энергии – анаэробный (гликолиз), аэробный (дыхание) и фотосинтез, но с преобладанием какого-либо из них.

Анаэробные организмы, положившие начало жизни на Земле, в атмосфере, богатой молекулярным кислородом, оказались в невы-

годных условиях. Одни из них вымерли, другие нашли экологические ниши, практически лишённые кислорода, или приобрели способность к дыханию. Считается, что наиболее приспособленными к новым условиям оказались эволюционировавшие в сторону эукариотов анаэробные одноклеточные, вступившие в симбиоз с аэробными клетками, в последующем превратившимися в митохондрии. Часть эукариотов, имевших митохондрии, в ходе эволюции вступила в симбиоз с хлорофиллсодержащими прокариотами, которые затем превратились во внутриклеточный фотосинтетический аппарат и дали начало эволюции растительного царства. Некоторые хлоропласты имеют сходные с цианобактериями размеры, способ укладки хлорофиллсодержащих мембран, нуклеотидная последовательность их ДНК почти полностью гомологична определенным участкам бактериальной хромосомы. Поглощению одних клеток другими, с последующим их симбиозом, способствовало, как говорилось выше, отсутствие способности дифференцировать «свое» от «чужого» на ранних стадиях филогенеза. Симбиоз фотосинтезирующих клеток с другими тилами клеток – явление достаточно частое, и ряд современных эукариотических клеток (например, *Cyanophora paradoxa*) содержат в себе истинные цианобактерии [4].

Наличие митохондрий и хлоропластов в эукариотических клетках привело к еще большей специализации различных компартментов клеток и появлению новых метаболических путей в них. Например, в связи с передачей функции образования энергии от плазматической мембраны митохондриям у плазматической мембраны эукариот появилась возможность приобретения новых свойств, в том числе в цепях клеточной сигнализации.

Появление у эукариот в ходе эволюции ядра, митохондрий, хлоропластов, лизосом, пероксисом, эндоплазматического ретикулума, цитоскелета и других внутриклеточных структур вызвало увеличение объема эукариотических клеток (примерно в 1000 раз по сравнению с прокариотическими), содержания в них ДНК, значительное увеличение поверхности клеточной мембраны, усложнение структуры как клеточной, так и внутриклеточных мембран. Различные мембраны и окруженные ими компартменты у эукариотов приобрели высокую специализацию (хранение генетической информации, секреторная функция, всасывание, биосинтетические процессы, преобразование энергии, межклеточная и внутриклеточная сигнализация и т.д.), между компартментами и внеклеточной средой возникает обмен веществ и необходимость его регуляции.

У одноклеточных организмов решающую роль в регуляции биохимических реакций играют активация ферментов с помощью различных ионов, субстратная индукция ферментов, изменение их активности под влиянием конечных продуктов реакции (регуляция по принципу обратной связи), жесткая и закономерная фиксация ферментов на мембранах. То есть у одноклеточных организмов происходит регуляция преимущественно за счет внутриклеточно (аутокринно) действующих метаболитов.

Но даже у прокариотов может быть регуляция уровня метаболических процессов при изменении условий внешней среды – при участии внешних сигналов, воспринимаемых рецепторами, расположенными в плазматической мембране или в периплазматическом пространстве. Рецепторы содержат узнающий и сигнализирующий компоненты. В частности, у *E.coli* выявлено около 20 рецепторов. Часть из них (хемотрецепторы) воспринимают специфические молекулы (узнающими компонентами) и передают сигналы (сигнализирующими компонентами) через метилированные хемотаксические белки на жгутики, обеспечивая направленное движение бактериальных клеток в сторону одних веществ и прочь от других. *E.coli* имеет около 6 жгутиков, у которых отсутствуют сократительные элементы. Жгутики вращаются "моторами" (расположенными в участках соединения жгутиков с клеточной мембраной), использующими энергию протонного градиента на плазматической мембране (а не энергию гидролиза АТФ). На поверхности *E.coli* имеются хемотрецепторы для хемотрактантов (от лат. *аттрахере* – привлекать), таких как галактоза, глюкоза, серин, цистеин, аланин, глицин, обеспечивающих положительный хемотаксис (движение в сторону хемотрактанта), а также для «репеллентов» – жирных кислот, спиртов, индола, ионов H^+ (рН<6,5), OH^- (рН>7,5), вызывающих отталкивающий эффект – движение бактерий в противоположном (от «репеллентов») направлении. В хемотрецепторах, обеспечивающих положительный хемотаксис, узнающий компонент является белком одновременно и связывающим химическое соединение (галактозу или другой аттрактант), и осуществляющим его транспорт в клетку [12].

У цианобактерий имеется трансмембранный белок бактериородопсин, в составе которого роль хромофора (светопоглощающей группировки) выполняет ретиналь. Галобактерии в присутствии кислорода синтезируют АТФ в ходе окислительного фосфорилирования, а при недостатке O_2 переключаются на фотосинтетический механизм. При этом освещение, при участии бактериородопсина, вызывает перекачку протонов изнутри клетки наружу – каждая молекула

белка перекачивает несколько сотен H^+ в секунду. Генерируемая таким образом протонодвижущая сила (протонный градиент) используется далее АТФ-синтезирующим ансамблем (в мембране) для фосфорилирования АДФ, с превращением его в АТФ. У галобактерий и окислительное, и фотофосфорилирование происходят при участии одного и того же АТФ-синтезирующего комплекса. Протонодвижущая сила может также запускать в галобактериях активный транспорт ионов и аминокислот.

Регуляция уровня внутриклеточных метаболических процессов у прокариот возможна путем индукции активности генов продуктом (индуктором), используемым клеткой для поддержания жизнедеятельности, а также участием в регуляции метаболитов, образующихся в процессе превращений индуктора. Например, активация лак-оперона у *E.coli* возможна лишь в присутствии лактозы (индуктора) и одновременном недостатке свободной глюкозы (рис.19.2). Лактоза необходима для деблокирования оператора путем предотвращения присоединения к нему белка-репрессора, что открывает путь для транскрипции структурных генов лак-оперона при участии РНК-полимеразы.

Однако для регуляции лактозного оперона необходимо наличие в клетке не только белка-репрессора (Р) и индуктора – лактозы, но и двух регуляторов. Дело в том, что РНК-полимераза, кодируемая GP_2 , с помощью своей субъединицы σ (сигма) «узнает» участок гена-промотора, примыкающий непосредственно к оператору, присоединяется к нему и начинает транскрипцию лишь после присоединения к другому участку промотора (удаленному от оператора) специального белка. Этот белок – активатор катаболизма (БАК), кодируемый GP_3 , имеет и другие названия: АКГ (активатор катаболитных генов), ЦСБ (цикlossenязывающий белок).

БАК является аллостерическим белком основного характера и благодаря этому может связываться с промотором ДНК и с цАМФ. Но если БАК по отношению к цАМФ обладает высоким сродством, то по отношению к ДНК – низким сродством, которое повышается в присутствии цАМФ. Присоединение цАМФ к БАК вызывает в нем конформационные изменения, необходимые для связывания БАК (в комплексе с цАМФ) с промотором.

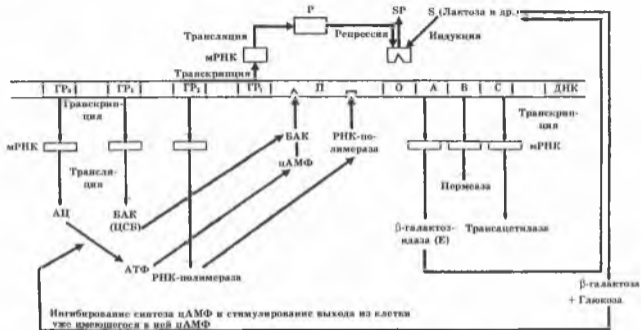


Рис.19.2. Схема регуляции биосинтеза белка путем индукции и репрессии транскрипции в лактозном опероне у *E. coli*. Обозначения: Π – промотор; O – оператор; A, B, C – структурные гены; S – субстрат; SP – комплекс субстрата с репрессором; P – репрессор, блокирующий оператор; БAK (ЦСБ) – белок активатор катаболизма (циклическо связывающий белок); цАМФ – циклический АМФ; АЦ – аденилатциклаза; GR – гены регуляторы

цАМФ образуется из АТФ при участии фермента аденилатциклазы (АЦ), кодируемого GP_4 . В регуляции концентрации цАМФ в клетке принимает участие глюкоза – метаболит, образующийся при гидролизе лактозы. Глюкоза снижает уровень цАМФ в клетках *E.coli*, вызывая быстрый выход из клетки уже имеющегося в ней цАМФ и ингибируя образование нового цАМФ. В отсутствие (или при недостатке) цАМФ не может произойти активация БАК и его присоединение к промотору, без чего невозможно функционирование РНК-полимеразы. В результате синтез β -галактозидазы не происходит даже в присутствии достаточного количества индуктора (лактозы). Добавление к питательной среде цАМФ активирует БАК, стимулируя синтез β -галактозидазы и тем самым способствуя гидролизу лактозы и катаболизму продуктов гидролиза лактозы.

Для транскрипции мРНК необходимо одновременное наличие БАК и цАМФ. У мутантов *E.coli*, дефицитных по АЦ, синтез мРНК и β -галактозидазы не происходит в отсутствие цАМФ, а у мутантных по БАК – без добавок этого белка. Максимальная скорость синтеза β -галактозидазы достигается только при одновременном внесении в среду цАМФ и БАК (при условии наличия в питательной среде достаточного количества лактозы).

При выращивании *E.coli* в отсутствие лактозы ее клетки содержат ничтожное количество β -галактозидазы. Если же в питательную среду внести лактозу, то начинается образование β -галактозидазы, содержание которой может повыситься на 3-4 порядка [14]. Следовательно, в данном случае субстрат путем дерепрессии оператора индуцирует появление большого количества фермента, способного использовать этот субстрат. Индуцированный синтез ферментных молекул начинается через 1-2 минуты после добавления индуктора. Если индуктор удаляют, то синтез прекращается через такое же время.

Повышение концентрации глюкозы – метаболита субстрата (лактозы), одновременно выполняющего роль индуктора, прекращает «работу» лактозного оперона вследствие резкого снижения концентрации цАМФ в клетке и невозможности присоединения (без цАМФ) БАК к промотору, что препятствует присоединению РНК-полимеразы к промотору и ее участию в транскрипции. То же самое происходит при добавлении в питательную среду избытка глюкозы, даже в присутствии достаточного количества субстрата-индуктора (лактозы).

Таким образом, у прокариотов для активации группы функционально связанных генов помимо индуктора (в данном случае – лактозы) необходим как бы сигнал голода (в данном примере – недостаток или отсутствие в клетке глюкозы), стимулирующий образование в

клетке цАМФ, выполняющего роль инициатора начала транскрипции и последующей трансляции, которые приводят к повышению скорости процессов внутриклеточного метаболизма. Появление в клетке (или повышение концентрации) глюкозы в свою очередь является сигналом для снижения концентрации цАМФ и, соответственно, для прекращения трансляции и транскрипции. Следовательно, у прокариотов сигналами, по которым изменяется содержание цАМФ в клетке, а отсюда скорость и направление метаболических процессов, являются колебания содержания метаболитов в клетке.

Исходя из концепции А.М. Уголева об универсальных функциональных блоках [17], которые мало меняются в ходе эволюции, близки или идентичны у организмов, стоящих на разных уровнях эволюционной лестницы, а также учитывая, что цАМФ выполняет роль универсального регулятора метаболизма не только у прокариотов, но и у эукариотов, в том числе у млекопитающих, можно было предположить наличие сходного с прокариотами механизма инициации транскрипции и у высших организмов.

Первоначально казалось, что у эукариотов роль цАМФ, содержание которого в клетке регулируется гормонами и другими биологически активными веществами, сводится лишь к активации протеинкиназ путем присоединения цАМФ к их регуляторной (рецепторной) субъединице. Сходство с прокариотами обнаруживалось лишь в одном. И у бактерий, и у животных цАМФ влияет на процессы обмена веществ путем взаимодействия с обладающим к нему сродством белком: у бактерий – вызывая конформационные изменения БАК в комплексе цАМФ-БАК и способствуя присоединению БАК, а затем и РНК-полимеразы к промотору; у животных – связывая регуляторную субъединицу и тем самым активируя фосфорилирующую каталитическую субъединицу протеинкиназы, которая, фосфорилируя гистоновые или негистоновые белки хроматина, вызывает дерепрессию определенных участков ДНК и стимулирует синтез строго определенных для каждого гормона фракций РНК.

Считалось, что комплекс цАМФ с регуляторной субъединицей малоактивен и остается в цитоплазме. В последующем появились данные, что возможна транслокация в ядро и самостоятельное функционирование в нем и каталитической, и регуляторной (в комплексе с цАМФ) субъединиц цАМФ-зависимых протеинкиназ. Для проверки предположения о том, что регуляторная субъединица протеинкиназы может влиять на уровень транскрипции, непосредственно взаимодействуя с матрицей по типу цАМФ-связывающего белка бактерий, было изучено изменение матричной активности хроматина под влия-

нием обработки регуляторной субъединицей в системе *in vitro*. Оказалось, что гомогенная регуляторная субъединица протеинкиназы из мозга свиньи при добавлении в стандартную РНК-полимеразную систему увеличивает матричную активность хроматина за счет увеличения числа мест инициации РНК. На основе экспериментов высказано предположение, что транслокация в ядро регуляторной субъединицы осуществляется независимо от каталитической и определяется специфическим взаимодействием с молекулами цАМФ [19].

В соответствии с вышеизложенным можно считать вполне вероятным, что функциональный блок, регулирующий транскрипцию прокариотов (цАМФ-БАК-промотор-РНК-полимераза), сохранился в процессе эволюции, выполняя подобную же функцию у животных и человека. Однако вследствие усложнения структуры хроматина (наличие гистоновых и негистоновых белков, препятствующих доступу регуляторных эффекторов и РНК-полимеразы к промотору ДНК) у животных и человека универсальный функциональный блок регуляции транскрипции также усложнялся за счет каталитической субъединицы, которая соединена и функционально сопряжена с регуляторной (цАМФ-зависимой) субъединицей протеинкиназ. Инициация синтеза цАМФ (гормонами, медиаторами и другими биологически активными веществами) ведет к повышению концентрации цАМФ в клетке, приводит к отделению от нее и активации каталитической субъединицы. И каталитическая, и регуляторная субъединицы проникают в ядро, выполняя каждая свои функции. Каталитическая субъединица специфически фосфорилирует белки хроматина, деблокируя определенные участки ДНК, обеспечивая доступ к промотору комплекса цАМФ и регуляторной субъединицы, после присоединения которого к промотору иницируется присоединение к нему РНК-полимеразы и начало транскрипции.

Можно полагать, что каталитические (фосфорилирующие) субъединицы обладают способностью «узнавать» определенные белки хроматина, а через них и определенные участки ДНК. Комплекс же цАМФ с регуляторной субъединицей менее специфичен, активируя освободившиеся (при участии каталитической субъединицы) от белка опероны.

Появившиеся в процессе эволюции каталитические субъединицы протеинкиназ у животных участвуют путем фосфорилирования белков не только в регуляции активности генов, но и в регуляции активности ферментов (например, активация в клетках печени фосфоорилазы и ингибирование гликогенсинтетазы), проницаемости мембран-

ных каналов, функционирования рибосом, эндоплазматического ретикулаума и др.

Ответ клетки на тот или иной гормон или другие биологически активные вещества, действующие через цАМФ-зависимые протеинкиназы, обусловлен набором в клетке тех или иных обладающих специфичностью действия протеинкиназ.

цАМФ является одной из наиболее древних сигнальных молекул, сохранившейся в ходе эволюции и участвующей в регуляторных процессах как у прокариотов, так и у высших организмов. У одноклеточных, помимо участия во внутриклеточной регуляции активности генов и тем самым регуляции биохимических процессов, цАМФ может действовать аналогично гормонам (дистантно), участвуя в межвидовом и внутривидовом межклеточном взаимодействии.

Известно, что некоторые почвенные амёбы – миксомицеты (*Dicystelium discoideum*) – питаются микроорганизмами, продуцирующими цАМФ, который служит хемоаттрактантом – сигнальной молекулой для миксомицетов (межвидовое химическое притяжение). При исчерпании запасов пищи (продуцирующих цАМФ бактерий) амёбы сами начинают усиленно секретировать цАМФ и мигрировать навстречу друг другу (внутривидовое взаимодействие), образуя агрегаты (до 100 тысяч и более клеток), способные к перемещению по почве в поисках лучших условий для последующего образования спор и их распространения.

Возможно, что примитивное объединение одноклеточных в колонии явилось наиболее ранней стадией, предшествующей появлению и дальнейшей эволюции многоклеточных, сопровождающейся эволюцией и регуляторных процессов.

Появление более высокоорганизованных многоклеточных организмов объясняется вероятно тем, что такие организмы могут использовать ресурсы, недоступные единичной клетке. Так, наличие множества клеток у животных позволяет им иметь органы передвижения не только в воде, но и на суше, в воздухе, облегчая тем самым поиски пищи, более благоприятных условий для жизни, защиту от врагов. Множество клеток у растений обуславливает возможность иметь у них корни (для поглощения воды и питательных веществ из почвы) и листья (для улавливания энергии солнечных лучей). При этом усложняется регуляция внутриклеточных процессов, в том числе механизмов контроля экспрессии генов, значительная часть которых или репрессирована гистоновыми или негистоновыми белками, или (в некоторых недифференцированных клетках) «разорвана» на

мини-гены (экзоны), разделенные в ДНК интронами. Появляется необходимость и в совершенствовании межклеточной регуляции.

Возникает вопрос – каким образом продолжалась эволюция метаболических процессов и механизмов их регуляции на последующих этапах многократно появлявшейся дивергенции и усложнения многоклеточных организмов?

Эволюция метаболических путей, вероятнее всего, шла путем последовательного добавления новых ферментативных реакций к существовавшим ранее, из которых наиболее древними считаются анаэробные реакции с участием фосфатов сахаров. Именно анаэробные метаболические пути должны были быть самыми древними, так как в атмосфере первобытной Земли кислорода не было. Не случайно поэтому практически во всех живых клетках в определенной последовательности протекают реакции расщепления глюкозы без участия кислорода (то есть анаэробно), сопровождающиеся образованием АТФ, используемого всеми клетками в качестве легко доступной химической энергии.

С превращением фосфатов сахаров, которые находятся в центре обмена веществ, в ходе эволюции оказались связанными сотни других химических реакций, отвечающих как за синтез новых малых и больших молекул, так и за расщепление сложных молекул пищи до более простых соединений. При этом подавляющее большинство реакций и катализирующих их ферментов, появившихся у прокариотов, характерно для всех современных живых существ – от бактерий до млекопитающих. По мере дивергенции организмов ферменты, катализирующие основные метаболические реакции, постепенно модифицировались, не изменяя своей функции.

Заслуживает внимания разрабатываемая в течение многих лет А.М. Уголевым [16,17] концепция о возможности эволюции живых организмов, стоящих на разных ступенях эволюционной лестницы (от самых низких до самых высоких) путем рекомбинации и транспозиции некоторого набора одних и тех же стандартных функциональных блоков, сформировавшихся в ходе эволюции на начальных ее этапах. Согласно концепции А.М. Уголева, в процессе эволюции на основе набора функциональных блоков могли возникать новые системы. При этом не исключается возможность изменений и эволюции самих функциональных блоков, а также появления в ходе эволюции новых функциональных блоков, включающихся в ранее возникшие системы блоков.

Сходное мнение высказывает Ю.М. Оленев [20], считающий, что в ходе эволюции используется более или менее постоянный набор де-

талей (типа «конструктор»), комбинируя которые по-разному можно изменять некоторые свойства клеточных типов, органов, организма. Ю.М. Оленев также признает относительный характер константности деталей в наборе, так как за счет небольших изменений в какой-либо детали набора (например, в первичной структуре белков) достижимы впечатляющие функциональные сдвиги.

Как правило, функциональный блок, первоначально открытый у одного вида организмов, затем обнаруживается и у других и может участвовать (в комплексе с другими блоками) для построения все новых и новых структур и функций.

Универсальным, прежде всего, является *генетический код*, представляющий собой по существу систему из триплетных нуклеотидных блоков, комбинации которых формируют гены, несущие информацию о первичной структуре белков, в свою очередь, включающихся в систему функциональных блоков.

За счет формирования и усовершенствования функциональных блоков сформировались такие специализированные функции, как секреторная, сократительная, гидролитическая, транспортная, рецепторная, информационная и др.

Функциональные блоки обладают способностью интегрироваться в разнообразные системы и образовывать их уникальные сочетания с превращением в блоки более высокого иерархического уровня.

Примером может служить цАМФ, действующая у одних одноклеточных (миксомицетов) в качестве межорганизменного гормона (межвидового и внутривидового), у других (*E.coli*) – в качестве внутриклеточного регулятора экспрессии генов.

У высших организмов в ходе эволюции цАМФ становится наиболее распространенным вторым посредником различных информонов (пептидных гормонов, цитокинов, катехоламинов, нейротрансмиттеров и других сигнальных молекул). И у *E.coli*, и у высших организмов цАМФ (о чем сказано выше) выполняет роль аллостерического регулятора. У *E.coli* он вызывает конформационные изменения белка активатора катаболизма, в комплексе с которым стимулирует присоединение РНК-полимеразы к промотору, инициируя транскрипцию генов лак-оперона. У высших организмов присоединение цАМФ к регуляторным субъединицам специфических протеинкиназ активирует их каталитические субъединицы, участвующие в фосфорилировании белков хроматина, рибосом, эндоплазматического ретикулума, молекул ферментов, мембранных белков и др. Следовательно, у высших животных цАМФ является универсальным регулятором активности

многих генов, внутриклеточных метаболических процессов, мембранной проницаемости.

На ранних стадиях эволюции возникли многие функциональные блоки: ферменты гликолиза, дегидрогеназы, кислые пептидгидролазы, α -амилаза, цитохром P-450, ферменты цикла трикарбоновых кислот, регуляторные пептиды, стероидные гормоны, гликокаликс, родопсин в фоточувствительных блоках, протонный насос и др., появившиеся у одноклеточных и сохранившиеся в ходе эволюции до высших животных.

Гликокаликс – сложный блок углеводов мембраны, связываемых белками (лектинами), встречающийся в клетках различных организмов – от амебы до человека. Углеводам гликокаликса принадлежит важная роль межклеточного узнавания и узнавания между клеткой и матриксом. С гликокаликсом связаны системы экзо- и эндоцитоза, в том числе механизмы внешней секреции, продукции гормонов, цитокинов, нейротрансмиттеров, фагоцитоз, пиноцитоз, интернализация макромолекул (поглощение клеткой мембранного гормон-рецепторного комплекса), трансцитоз (на одном полюсе клетки – эндоцитоз, на другом – экзоцитоз).

Протонный насос способен участвовать в синтезе АТФ за счет энергии перемещения протонов (H^+), либо, напротив, создавать протонный градиент – при расходовании АТФ. Протонный насос широко распространен у всех организмов, локализован у прокариот в клеточной мембране, у эукариот – в митохондриях, в растениях, кроме того, в фотосинтезирующих органеллах.

Фоточувствительные блоки содержат в своем составе родопсин – в сетчатке глаз (у человека, осьминогов, кольчатых червей и др.), в светочувствительных элементах простейших и у некоторых прокариотов – в бактериородопсине.

Моноксигеназные универсальные блоки, акцептором электронов в которых является цитохром P-450, встречаются на всех уровнях эволюционного развития. Гемопротейд, содержащий цитохром P-450, у прокариотов находится в цитоплазме в растворенном состоянии, у эукариотов – преимущественно в мембране эндоплазматического ретикулума.

Филогенетически более молодыми функциональными блоками являются Na^+K^+ -АТФаза, $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -АТФаза, сократительные белки (актомиозиновые комплексы и др.).

Na^+K^+ -АТФаза обеспечивает поддержание натрий-калиевых градиентов между вне- и внутриклеточными средами у всех исследованных

типов животных, включая насекомых, но не обнаружена у прокариот. $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -АТФаза, интегрируясь в разнообразные системы, может участвовать в информационной деятельности как компонент мембраны нейронов, в пищеварительно-транспортных функциях энтероцитов, в секреторных функциях клеток поджелудочной железы, в функциях сокращения, экскреции, в ряде функций почечных канальцев.

Сократительные белки широко распространены в живой природе. В частности, актомиозиновые комплексы присутствуют практически во всех (возбудимых и невозбудимых) клетках беспозвоночных и позвоночных, большинства растений и грибов. В мышцах актин, как правило, связан с регуляторными белками (тропонином, тропомиозином и др.).

Соотношение актина, миозина и регуляторных белков в различных типах клеток различное. Так, в поперечнополосатых мышцах позвоночных отношение нерастворимых белков (актин+миозин) к растворенным (тропомиозин, тропонин и др.) составляет в среднем 3,5/1, а в гладких – 1/1,5-1/3. В мышцах содержание миозина достигает 55-60% к общему белку, актина – 20-25%; в немышечных клетках миозина содержится 1,0-1,5%, актина – 10-15%. В основе регуляции сокращения мышц лежит присоединение ионов Ca^{2+} к регуляторным белкам – тропонину (актиновый тип регуляции) или легким цепям миозина (миозиновый тип регуляции), которые в отсутствии кальция препятствуют взаимодействию актина с миозином. У большинства беспозвоночных существуют оба типа регуляции, за исключением моллюсков, у которых имеется только миозиновый тип. У позвоночных в гладких мышцах показано наличие обоих типов регуляции, а в сердечной и скелетных – только актинового.

Компоненты актомиозинового комплекса полифункциональны. В частности, помимо структурной и сократительной функций, миозин обладает каталитической (АТФазной и креатинкиназной) активностью, а актин активирует АТФазу миозина, ДНКазу, имеет отношение к фактору злонгаии. Актиномиозиновый комплекс принимает участие не только в сокращении мышц, но и в транспорте гормонов и ферментов из секреторных клеток, в двигательных реакциях, связанных с делением ядерного материала, перемещениях цитоплазмы внутри клетки.

В ходе эволюции возможно перераспределение функциональных блоков в пределах клетки. Например, Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФаза, являющаяся типичным насосом эндоплазматического ретикулума, может быть обнаружена в клеточной мембране; цитохром Р-450, у прокариот локализованный в цитоплазме, у эукариот в ходе эволюции перемеща-

ется в эндоплазматический ретикулум. Возможна и транспозиция функциональных блоков между клетками и органами. В частности, известно филогенетическое перемещение инсулинопродуцирующих клеток из тонкой кишки (у круглоротых) в поджелудочную железу (у высших позвоночных). В составе ядов змей, насекомых, амфибий и многих других организмов выявлены известные ферменты и гормоны. Например, бомбезин, выполняющий у млекопитающих роль релизинг-фактора в отношении гормонов желудочно-кишечного тракта и присутствующий в центральной нервной системе, у амфибий выделяется клетками кожи, выполняя функцию яда. АТФ – один из главных аккумуляторов и источников энергии, а также аминокислоты глутамат и глицин используются некоторыми нейронами в качестве нейротрансмиттеров.

Примером эволюции самих функциональных блоков служат эволюционные изменения наиболее древних блоков – пищеварительных ферментов гидролаз, в том числе появление в ходе эволюции (в результате модификации сериновых пептидгидролаз) тромбина, а также лактазы. Лактаза в качестве функционального блока появляется (в результате модификации гидролаз) на стадии эволюции, предшествующей появлению млекопитающих, одновременно с транспортной системой переноса продуктов реакции (глюкозы и галактозы) во внутреннюю среду организма.

Нередко сложившиеся в ходе эволюции на наиболее ранних этапах системы функциональных блоков, участвующих в определенных метаболических процессах, дополняются новыми блоками, необходимость в которых в определенной мере обусловлена средой обитания и образом жизни.

Как известно, метаболизм азотосодержащих веществ у всех живых организмов сопровождается образованием высокотоксичного аммиака, а заключительная стадия – удаление его избытка, различна у различных организмов:

- у одноклеточных аммиак удаляется наружу через цитоплазматическую мембрану;
- у рыб аминный азот транспортируется кровью в виде глутамина в жабры, где от него в результате гидролиза (при участии глутаминазы) отщепляется аммиак, легко растворимый в воде и уносимый ею от жабер;
- большинство наземных животных с появлением почек и мочевого пузыря приобрело способность выделять аминный азот в виде нейтральной, нетоксичной, хорошо растворимой в воде мочевины, не подвергающейся реабсорбции в кровь;

– у головастиков, постоянно живущих в воде, аминный азот выделяется через жабры (как у рыб) в виде аммиака, а у взрослой лягушки, значительную часть времени обитающей на суше, – преимущественно в виде мочевины (как у большинства наземных животных);

– у птиц в ходе эволюции появились функциональные блоки, катализирующие реакции, в результате которых весь аминный азот выводится из организма в виде мочевой кислоты, не требующей для выведения значительного количества воды и наличия мочевого пузыря (что выгодно для полета).

Многие функциональные блоки выполняют элементарные функции, которые имеют различное биологическое значение в зависимости от того, в какой функциональный комплекс они включены.

Можно представить, как уникально происходило формирование сочетаний функциональных блоков в системе метаболического цикла трикарбоновых кислот, который лежит в основе энергетики современных организмов и является наиболее эффективным инструментом использования кислорода. Основные компоненты этой системы (в том числе предшествующие циклу ферменты гликолиза и различные дегидрогеназы) возникли еще в анаэробный период, а некоторые из них (ацетат и ацетил-КоА) могли возникнуть ранее появления первых живых организмов. Транспортные же системы переноса электронов от дегидрогеназ на кислород не могли возникнуть раньше, чем в атмосфере появился свободный молекулярный кислород.

Таким образом, цикл трикарбоновых кислот – один из наиболее совершенных и эффективных механизмов метаболизма – сложился в результате соединения различных функциональных блоков, которые, по всей вероятности, возникли не только независимо, но и в разное время.

В ходе эволюции путем естественного отбора – в результате конкуренции – шансы на выживание получали те организмы, которые наиболее оптимально использовали энергетические ресурсы. Именно цикл трикарбоновых кислот обладает существенными преимуществами перед другими путями окисления ацетата, так как в нем наиболее велика роль дегидрогенизации по сравнению с присоединением кислорода к субстрату [16]. В результате последующего переноса электронов и протонов на кислород обеспечивается наиболее полное освобождение энергии и получение наибольшего количества АТФ, то есть достижение максимально возможного функционального эффекта.

Весьма интересна эволюция электронтранспортных цепей, сопряженных с синтезом АТФ и возникших до появления цикла трикарбоновых кислот. После появления цикла эти цепи продолжали функ-

ционировать за пределами цикла трикарбоновых кислот, хотя большинство из них стали как бы привязанными к нему.

Эффективный способ синтеза АТФ возник на ранних этапах эволюции и с тех пор подвергался лишь незначительным изменениям. Механизмы использования энергии для синтетических процессов в организме одинаковы.

Древнейшие клетки в анаэробных условиях вероятно синтезировали АТФ с помощью процессов брожения, конечными продуктами которых могли быть молочная, муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, янтарная и другие кислоты. При брожении АТФ образуется путем субстратного фосфорилирования, при котором используется энергия, высвобождаемая в реакциях частичного окисления органических молекул (например, глюкозы), образовавшихся в избытке в результате геохимических процессов. В анаэробных условиях выделяемый при окислении органических молекул водород переносится (через НАДФ или НАДФН) на какую-то другую органическую молекулу. Значительная часть продуктов брожения выводится из клетки, а другая часть (например, пируват) используется для биосинтеза. По-видимому, ключевые компоненты электронтранспортной цепи – протонные насосы и АТФ-синтетаза – возникли позднее.

Гипотетически можно представить три стадии в эволюции процессов фосфорилирования, сопровождающихся образованием АТФ [4].

Вначале в результате накопления продуктов брожения (органических кислот) происходит закисление среды, угрожающее жизни клетки. Сохранялись те клетки, в которых появились трансмембранные (протонные) насосы, откачивающие ионы H^+ из клетки как без сопряжения с гидролизом АТФ, так и за счет использования энергии гидролиза АТФ.

На второй стадии одновременно с накоплением продуктов брожения (несбраживаемых органических кислот) происходило истощение запаса сбраживаемых веществ, за счет окисления которых мог осуществляться транспорт метаболитов и другие жизненные процессы. В создавшихся условиях в результате естественного отбора выживали те бактерии, которые были способны выводить ионы H^+ без гидролиза АТФ, сохранявшегося при этом для других надобностей. В этот период возможно появились первые мембранные белки, которые могли использовать перенос электронов между молекулами (накопившихся органических кислот) с различным окислительно-восстановительным потенциалом в качестве источника энергии для протонного насоса (для выведения H^+ из клетки).

На третьей стадии у некоторых бактерий высокая эффективность цепи переноса электронов способствовала тому, что энергии запаса-лось больше, чем было нужно для поддержания оптимальной кон-центрации ионов H^+ внутри клетки. Большой электрохимический гра-диент, создаваемый за счет откачивания протонов, позволил прото-нам переходить обратно в клетку через АТФ-зависимые протонные насосы, которые за счет обратимости функционирования начинали действовать в роли АТФ-синтетазы. Поскольку запасы сбраживаемых питательных веществ в природе продолжали уменьшаться, а бакте-рии с функционирующими АТФ-синтетазами требуют для процессов жизнедеятельности гораздо меньше питательных веществ, то такие бактерии в ходе эволюции получили значительное преимущество.

Истощение запасов сбраживаемых субстратов (основных источ-ников НАДН и НАДФН) и возрастание роли мембранной АТФ-синтетазы в образовании АТФ способствовало резкому снижению запасов НАДФН и других восстановителей, потенциально способных быть донорами водорода для превращения нового источника углерода (атмосферного CO_2) в органические молекулы, прежде всего в глюкозу.

Полагают, что главный «прорыв» в эволюции энергетического ме-таболизма произошел больше 3 млрд. лет назад, когда у предшест-венников зеленых серных бактерий возникли фотохимические реак-ционные центры, способные синтезировать НАДН, а затем и НАДФН путем переноса атома водорода (в виде электрона и протона) от мо-лекулы сероводорода на $НАД^+$ и $НАДФ^+$ за счет лучистой энергии [4]. В течение некоторого времени серные (зеленые и пурпурные) бакте-рии были, вероятно, широко распространены и являлись единствен-ными фотосинтезирующими организмами на Земле. Позднее, с по-явлением синезеленых водорослей (цианобактерий) и эукариотиче-ских растений, в роли окислительного субстрата, поставляющего атомы водорода для синтеза НАДФН, необходимого для процессов восстановления, выступает вода. При этом в атмосферу выделяется O_2 . Такое фотохимическое расщепление является единственной из-вестной реакцией биологического окисления H_2O , так как лишь фото-химические реакционные центры фотосинтезирующих организмов способны отщеплять от молекул воды атомы водорода, использу-емые затем для восстановления CO_2 [21].

В современных фотосистемах, вероятно, объединились две фо-тосистемы: I – с происхождением от зеленых бактерий, II – от циано-бактерий. Объединение в ходе эволюции двух фотосистем в одну имело далеко идущие биологические последствия, так как в ней за

счет солнечной энергии одновременно происходит синтез и АТФ, и НАДФН. Это способствовало накоплению большого количества восстановленного органического материала, синтезированного живыми клетками, и впервые в атмосферу стал поступать молекулярный кислород.

При обилии кислорода и органических молекул у многих бактерий вырабатывается эффективный аэробный метаболизм с расщеплением углеводов и других молекул до CO_2 и H_2O и освобождением энергии, используемой для синтеза АТФ. При этом в электронтранспортных цепях, вероятно, появились вначале аэробные дегидрогеназы (например, флавопротеины), способные переносить электроны и протоны как на восстанавливаемые метаболиты, так и на молекулярный кислород (с образованием H_2O_2).

Следующим этапом, по-видимому, явилось образование цитохромоксидазы – за счет модификации других цитохромов, благодаря чему стала возможной передача электронов от окисляемых субстратов на активированный кислород (как конечный акцептор электронов), с последующим присоединением к нему протонов и образованием H_2O .

В ходе дальнейшей эволюции появились бактерии, в том числе предшественники *E.coli*, получившие независимость от лучистой энергии, полностью перешедшие на дыхательный метаболизм, способные синтезировать АТФ путем окислительного фосфорилирования (с участием ранее возникшей мембранной АТФ-синтетазы). Затем, как показано выше, некоторые «дышащие» бактерии стали эндосимбионтами в примитивных эукариотических клетках, превратившись в них в митохондрии. Еще позднее произошло поглощение аэробными эукариотическими клетками фотосинтезирующих бактерий, которые также приобрели статус эндосимбионтов.

Синтез АТФ за счет субстратного и окислительного фосфорилирования сохранился в клетках на всех этапах эволюции живых организмов, а в хлорофиллсодержащих клетках (некоторых бактерий и у всех растений), кроме того, сохранился синтез АТФ путем фотофосфорилирования.

В настоящее время в живой природе существует большое разнообразие терминальных реакций переноса электронов с ферментов электронтранспортных цепей на кислород, возникших в ходе эволюции как у различных видов, так и в различных органеллах клеток одного и того же вида животных и растений (с участием флавопротеидов, цитохромоксидазы, цитохромов Р-450, полифенолоксидаз, полифенолпероксидаз, аскорбатоксидазы и др.).

В животном мире имеет место абсолютное преобладание цитохромных дыхательных систем, у клубней картофеля преобладает полифенолоксидазная система, у белокачанной капусты - аскорбатоксидазная. Может быть смена системы в процессе онтогенеза. Например, у проростков семян ячменя перенос электронов на кислород происходит, главным образом, за счет цитохромов, а у взрослых растений – за счет ФАД-системы.

В печени животных существует несколько типов терминальных переносов электронов на кислород, локализованных в различных органеллах. Так, например, в митохондриях печени терминальным ферментом является цитохромоксидаза, в микросомной фракции эндоплазматического ретикулума – цитохром P-450, в пероксисомах – флавопротеиды.

Эволюция крупных многоклеточных организмов, в том числе высших животных, связанная со способностью эукариотических клеток по-разному экспрессировать наследственную информацию, с уменьшением этих клеток функционировать сообща, шла в направлении создания всевозрастающего числа специализированных клеточных типов, сопровождающегося совершенствованием и все большим разнообразием систем метаболических функциональных блоков.

Большое разнообразие метаболических процессов в различных органах и тканях обусловлено дифференцировкой десятков или сотен специализированных клеточных типов, в каждом из которых наряду с некоторым числом генов, контролирующими общеклеточные функции, активны свои, специфические для данного типа клеток гены.

По мере того, как вместе с увеличением размеров и сложности организмов усложнялись межклеточные связи, происходило эволюционное совершенствование систем регуляции и усиление их роли в регулировании, интеграции и координации важнейших форм жизнедеятельности. Из специализированных систем регуляции у животных, вероятно, вначале появились нервная и эндокринная, которые возникли у беспозвоночных и развивались, как полагают, параллельно [16, 22, 23].

Позднее у позвоночных появилась иммунная система. Наивысшего развития нервная, эндокринная и иммунная системы регуляции получили у гомойотермных животных.

Эволюционно более древняя генетическая система, выполняющая основную роль в регуляции внутриклеточных процессов, цитодифференцировки и морфогенеза, обусловила появление в ходе эволюции нервной, эндокринной и иммунной систем.

В организме человека и животных в ходе эволюции сформировалась единая нейроэндокринноиммунная система регуляции [24–27], которая постепенно сузила функции генетической системы до внутриклеточного уровня и приняла на себя полностью управление сформировавшимся, весьма сложным организмом. Этот централизованный аппарат управления выполняет всеобъемлющую функцию по координации деятельности всех органов и систем как единого целого, обеспечивая адаптацию к постоянно меняющимся факторам внешней и внутренней среды, результатом чего является сохранение гомеостаза, необходимого для поддержания нормальной жизнедеятельности организма и его резистентности.

Нервная, эндокринная и иммунная системы регуляции выступают, с одной стороны, как самостоятельные, а с другой – как тесно взаимодействующие системы.

Имеются многочисленные факты, свидетельствующие о существовании взаимосвязи трех главных систем регуляции. Прежде всего, это наличие хорошо развитой симпатической иннервации центральных и периферических лимфоидных органов и некоторых эндокринных желез, а также рецепторов к нейромедиаторам и гормонам как в лимфоидных органах, так и на отдельных иммунных лимфоцитах (к ацетилхолину, катехоламинам, серотонину, нейро- и миелопептидам, фактору роста нервов и др.).

Нервные окончания в тимусе, костном мозге, селезенке, лимфатических узлах и других лимфоидных органах приближаются к лимфоцитам на расстояния, сравнимые с таковыми для контактов с мышечными и сосудистыми клетками. Поэтому циркулирующие в организме лимфоциты и макрофаги в лимфоидных органах могут вступать в непосредственный контакт с нервными волокнами и своими собственными рецепторами воспринимать нейрорегуляторные влияния [31]. В центральной нервной системе и в железах внутренней секреции, в свою очередь, имеются рецепторы к медиаторам иммунной системы (интерлейкинам, миелопептидам, гормонам тимуса пептидной природы и др.).

В нервной, эндокринной и иммунной системах обнаружены общие гормоны и медиаторы.

Например, в функционировании нервной системы существенная роль принадлежит опиоидным нейропептидам (эндорфинам и энкефалинам), секретлируемым некоторыми нейронами. Эти же нейропептиды синтезируются в гипофизе и являются составной частью, действующим началом лейкоцитарного интерферона, миелопептидов костного мозга, тимозина, некоторых медиаторов лимфоцитов В

нейронах, некоторых клетках иммунной системы, в гипофизе обнаружен ген проопиокортина – пептида, состоящего из 134 аминокислотных остатков, при специфическом протеолизе которого образуются опиоидные пептиды (метэнкефалины, α -, β -, γ -, δ -эндорфины). Все они принимают участие (как сигнальные молекулы) в нейроэндокринноиммунных взаимоотношениях и подобно морфину снимают болевые ощущения. Помимо опиоидных пептидов, в осуществлении нейроэндокринноиммунных взаимодействий принимают участие и другие биологически активные вещества (ацетилхолин, норадреналин, серотонин, дофамин, гипоталамические либерины, соматотропин, кортикотропин, интерлейкины и др.). Ацетилхолин образуется в нейронах и лимфоцитах, соматотропин – в гипофизе и лимфоцитах. Интерлейкин-1 продуцируется преимущественно мононуклеарными фагоцитами, его продуцентами являются также нейтрофилы, некоторые лимфоциты, мозговое вещество надпочечников, клетки нейроглии, нейроны головного мозга и периферического отдела симпатической нервной системы.

Обращает на себя внимание тот факт, что многие регуляторные (сигнальные) молекулы, синтезируемые клетками нервной, эндокринной и иммунной систем позвоночных, встречаются и у организмов на самых ранних этапах эволюции. Так, например, в современных микросимбиозах в качестве сигнальных молекул для общения между таксономически отдаленными организмами (микро- и макроорганизмами) особенно широко используются регуляторные пептиды, в том числе опиоидные (см. 19.3). Эти пептиды прошли долгий путь эволюционного развития от одноклеточных и беспозвоночных (насекомых, ракообразных) до позвоночных, в том числе млекопитающих. Аденилатциклаза, цАМФ, кальмодулин и Ca^{2+} также обнаружены у бактерий, беспозвоночных и позвоночных животных, что свидетельствует об общности механизмов проведения сигналов от регуляторных молекул внутрь клетки.

Известны реакции амёб на опиоидные пептиды, активация аденилатциклазы простейших адреналином, участие продуцируемых бактериями регуляторных пептидов в интеграции иммунной и нервной систем млекопитающих. У инфузорий, грибов, бактерий обнаружено большое число регуляторных пептидов (инсулин, соматостатин, кортикотропин, опиаты), катехоламины и другие гормоноподобные вещества, которые выполняют функцию хемосигналов; их наличие иногда обозначают как «примитивный тип нервной системы» [28]. Многие из бактерий выделяют в окружающую среду цАМФ, выступающий у них в качестве как внешнего сигнала, так и вторичного посредника,

избирательно регулирующего экспрессию многих генов. В клетках и внеклеточной среде бактерий, простейших и грибов выявлен иммунореактивный белок – тимозин α_1 , у бактерий и дрожжей – антигены, относящиеся к белкам семейства иммуноглобулинов, то есть молекулам клеточной адгезии, поверхностным антигенам лимфоидных клеток, рецепторам ростовых факторов (интерферонов, интерлейкинов, эпидермального фактора роста). Многие из перечисленных регуляторных молекул и их рецепторов широко используются прокариотами для межклеточных, внутривидовых и межвидовых контактов (см. 19.3).

Основные нейротрансмиттеры (ацетилхолин, катехоламины, пептиды, аминокислоты и их производные и некоторые другие информоны) используются как примитивной нервной системой (кишечно-полостных, круглых червей и др.), так и нервной, эндокринной и иммунной системами высших животных, а также некоторыми прокариотами и простейшими.

Возникшие в ходе эволюции нервная, эндокринная и иммунная системы у высших животных представляют собой наиболее совершенный централизованный аппарат управления. Эти три системы взаимодействуют по принципу взаимной регуляции, которая обеспечивается комплексом взаимосвязанных механизмов, в том числе участием дублирующих факторов регуляции (информонов – химических сигнальных молекул).

Эти механизмы регуляции действуют на клеточном, системном и межсистемных уровнях, обеспечивая высокую степень надежности нейроэндокринноиммунных процессов регуляции.

В то же время высокий уровень реактивности всех систем регуляции и сложность организации их аппарата являются факторами риска развития иммунологических, неврологических и эндокринных расстройств, так как при патологии одной системы повышается риск расстройства и других систем. В частности, нарушения нейроэндокринных механизмов регуляции могут играть важную роль в патогенезе иммунологических расстройств, а иммунологические механизмы могут участвовать в патогенезе нервных и эндокринных болезней. При срыве компенсаторных механизмов может возникнуть сочетанная патология нервной, эндокринной и иммунной систем независимо от первичной локализации патологического процесса в той или иной системе [25].

19.3. Взаимосвязь эволюции регуляторных молекул и взаимоотношений между макро- и микроорганизмами в биосимбиозах

Появление в процессе эволюции сапрофитов (микроорганизмов, питающихся за счет органических веществ неживых объектов), с последующим приобретением некоторыми из древних сапрофитов факторов патогенности, привело к их адаптации к существованию за счет биосинтетических потенций других организмов, в том числе высших. Это послужило основой формирования специфических экологических систем – *паразитоценозов*, в которых организмы одного вида являются средой обитания и жертвами другого. Между ними идет непрерывная борьба.

В ходе биологической эволюции у микроорганизмов выработались приспособления к перемещению в пространстве и внедрению в тела очередных жертв по путям пищевых, репродуктивных и других экологических связей между живыми существами. Эти приспособления обеспечивают в течение миллионов лет жизнь множества разнообразных микробных паразитов, которые могут быть локализованы в различных структурах тканей.

Агрессии микроорганизмов в той или иной степени подвержены все биологические виды. В свою очередь, выживаемость пораженных видов зависит от их способности вырабатывать в процессе эволюции устойчивость к воздействию патогенных биологических агентов путем совершенствования факторов естественной резистентности и филогенетически более молодых механизмов регуляции специфического иммунного ответа.

Однако уже на ранних этапах эволюции происходило формирование не только антагонистических, но и симбиотических отношений. Даже ряд современных эукариотических клеток содержат в себе истинные цианобактерии, осуществляющие фотосинтез для клеток-хозяев в обмен на «приют» и питание [4].

Как было отмечено выше (см. 19.2), вероятно, хлоропласты и цианобактерии, митохондрии и аэробные бактерии имеют общих предков – прокариот, захваченных большими по размерам эукариотическими клетками, вступившими с соответствующими бактериями в симбиотические отношения.

С усложнением многоклеточных происходило совершенствование симбиотических отношений между макро- и микроорганизмами, достигших наибольшего развития у млекопитающих и птиц, у которых происходит формирование, особенно в желудочно-кишечном тракте,

характерных для каждого вида животных микробиоценозов. В желудочно-кишечном тракте человека и животных, преимущественно в толстом отделе кишечника (а у жвачных – и в преджелудках), в симбиозе с макроорганизмом постоянно (в течение всей жизни) обитают облигатные (обязательные, автохтонные, индигенные, резидентные) сапрофитные бактерии и транзитные (добавочные, аллохонные) микроорганизмы. У человека насчитывается примерно 10^{14} микробных клеток, что на порядок выше числа клеток всего организма (10^{13}). Число облигатных анаэробных микроорганизмов (бифидобактерии и молочнокислые) в 100-1000 раз превышает число аэробных (кишечная палочка и энтерококки).

Деятельностью микроорганизмов желудочно-кишечного тракта обусловлено поступление в организм животного (путем всасывания в кишечнике) бактериальных метаболитов, в том числе вторичных нутриентов и продуктов жизнедеятельности бактерий. Среди вторичных нутриентов (первичными являются всасываемые в кровь продукты гидролиза ферментами животного питательных веществ, витамины, минеральные и другие вещества пищи) могут быть модифицированные микрофлорой питательные вещества пищи (синтезируемые бактериями витамины, незаменимые аминокислоты) и балластные вещества – неперевариваемые пищеварительными ферментами лигнин, целлюлоза, гемицеллюлоза и др. (некоторые моносахариды, летучие жирные кислоты и др.). Продукты жизнедеятельности бактерий могут быть индифферентными, токсическими или регуляторными.

У некоторых видов животных в ходе эволюции вторичные нутриенты бактериального происхождения стали одними из главных источников питания. Так, у жвачных животных до 60% белков пищи при участии ферментов микроорганизмов преджелудков могут быть полностью разрушены до аминокислот, CO_2 и NH_3 и синтезированы заново в виде бактериальных белков, более полноценных по аминокислотному составу по сравнению с исходными растительными. Микросимбионты у жвачных являются единственными источниками некоторых витаминов группы В, а также ферментов целлюлазы и целлобиазы, необходимых для гидролиза клетчатки до β -глюкозы, изомеризирующейся в α -глюкозу. α -Глюкоза частично подвергается сбраживанию с образованием летучих жирных кислот (ЛЖК – ацетата, пропионата, бутирата и др.). Целлюлаза встречается также у ряда брюхоногих моллюсков, кольчатых червей, иглокожих, некоторых ракообразных, рептилий и рыб. У термитов бактерии реализуют не только образование вторичных нутриентов из древесины, но и фиксацию

азота на балластных веществах, что представляет собой уникальный случай в животном мире [16].

Микрофлора кишечной стенки является облигатной, локализованной в интимной близости с эпителиальными клетками слизистой и обеспечивает индивидуальные особенности микрофлоры (колониционную резистентность), отражающиеся в ее стабильности [28]. До 97% микрофлоры кишечной стенки представлено анаэробами: бифидо-, пропионобактериями и др.

Микрофлора содержимого полости желудочно-кишечного тракта включает как облигатную, так и транзитную микрофлору.

Одной из важных функций нормальной микрофлоры кишечника является ее участие в кооперации с организмом хозяина в обеспечении стабильности соответствующего микросимбиоза (привлечение облигатной и элиминация транзитной микрофлоры) и тем самым в повышении колонизационной резистентности.

Колонизационная резистентность находится, с одной стороны, под прессом транзитной микрофлоры, отражающей состояние окружающей среды, а с другой – зависит от состояния организма хозяина (возраста, состояния нервной, эндокринной и иммунной систем регуляции), который сам испытывает непосредственное давление окружающей среды. Трансформация колонизационной резистентности под влиянием внешних и внутренних факторов нередко сопровождается увеличением числа и спектра потенциально патогенных микроорганизмов и возникновением инфекционных заболеваний.

Кишечная облигатная микрофлора имеет отношение к иммунной защите организма, участвуя в контроле состава и численности бактериальных популяций путем непосредственного угнетения условно-патогенной микрофлоры и стимуляции механизмов местного иммунитета (синтеза локальных антител, включая IgA). У безмикробных животных (в эксперименте), по сравнению с обычными, содержится в 10 раз меньше клеток, продуцирующих IgA и более низкое содержание в плазме крови общего белка, α -, β - и γ -глобулинов [16]. Фиксация на энтероцитах молекул IgA и расположение в непосредственной близости от них облигатной микрофлоры препятствует адгезии к кишечной слизистой транзитной микрофлоры.

Как указано выше, среди бактериальных метаболитов в кишечнике, помимо полезных и индифферентных, образуются и токсические вещества. Некоторые из токсических веществ обладают высокой физиологической активностью и, по-видимому, в ходе эволюции включились в регуляторные системы (гистамин, серотонин, тирамин, кадаверин и другие амины).

Например, существует эндогенный (продуцируемый клетками хозяина) и экзогенный (продуцируемый микробами) гистамин, при гиперфункции которого бактериальной флорой возможно появление язв желудка и кишечника, а также аллергических реакций.

Возникает вопрос – каким же образом организм хозяина участвует в поддержании, хотя и относительной, стабильности колонизационной резистентности и индивидуального постоянства облигатной микрофлоры в желудочно-кишечном тракте?

Прежде всего, организм - хозяин и микросимбиозноз представляют собой единую, эволюционно сформировавшуюся (генетически и физиологически) систему, в которой произошла коадаптация двух систем (хозяина и паразитов). Единство сформировавшейся системы обеспечивается тем, что рецепторы и регуляторные молекулы эукариотических клеток хозяина специфичны по отношению к лигандам и рецепторам облигатных микроорганизмов. Специфические лиганд-рецепторные взаимодействия могут быть врожденными – генетически обусловленными (видовыми и индивидуальными) и приобретенными (индивидуальными и групповыми). Например, у однояйцевых близнецов отмечается сходство доминирующих анаэробных популяций микрофлоры кишечника, а также сходность выделяемых микробами метаболитов. Приобретенная, главным образом количественная коррекция колонизационной резистентности возможна под влиянием экологических условий внешней среды, особенностей геохимических провинций, индивидуальных условий жизни.

В качестве лигандов – сигнальных молекул (информонов), используемых в микросимбиознозе для общения между таксономически отдаленными организмами, особенно широко распространены регуляторные пептиды, прошедшие долгий путь эволюционного развития от одноклеточных до многоклеточных. Структурная и функциональная консервативность некоторых регуляторных пептидов настолько высока в эволюции, что становится вполне реальным как влияние информонов хозяина на регуляцию метаболических процессов микросимбионтов, так и влияние информонов микробов на метаболические процессы в клетках хозяина.

У инфузорий, грибов, бактерий обнаружено большое число регуляторных пептидов (инсулин, соматостатин, кортикотропин, опиаты, катехоламины и другие гормоноподобные вещества), которые выполняют функции хемосигналов, их наличие иногда обозначают как «примитивный тип нервной системы» [28]. Многие из бактерий выделяют в окружающую среду цАМФ, выступающий у них в качестве как внешнего сигнала, так и вторичного посредника, избирательно регу-

лирующего экспрессию многих генов. В клетках и внеклеточной среде бактерий, простейших и грибов выявлен иммунореактивный белок – тимозин α_1 , у бактерий и дрожжей – антигены, относящиеся к белкам семейства иммуноглобулинов, то есть молекулам клеточной адгезии, поверхностным антигенам лимфоидных клеток, рецепторам ростовых факторов (интерферонов, интерлейкинов, эпидермального фактора роста). Многие из перечисленных регуляторных молекул и их рецепторов широко используются прокариотами. Например, некоторые вирулентные представители *E. coli* имеют рецептороподобные структуры для связывания интерлейкина (ИЛ-1), используемого ими в качестве стимулирующего фактора роста. Эти и другие факты свидетельствуют о том, что в процессах восприятия сигнала, его трансформации и включения эффекторных ответов у бактерий принимают участие регуляторные системы, в основе функционирования которых заложены те же принципы лиганд - рецепторного взаимодействия, которые характерны для эукариотических клеток хозяина.

Следовательно, организмы животных и человека можно рассматривать как единую систему более высокого иерархического уровня, чем отдельный индивидуум, в которой в ходе эволюции макроорганизм приобрел функцию доминанта и регулятора всей системы в целом. А.М. Уголев [16] считает, что в метаболическом смысле макроорганизм является надорганизмом, а кишечная микрофлора – эволюционно закрепленной формой сосуществования большинства многоклеточных организмов.

Однако в настоящее время все больше накапливается фактов о возможности влияния бактериальных антигенов кишечника на макроорганизм через взаимосвязанные нервную, эндокринную и иммунную системы. Кишечная нервная система в значительной мере обладает автономностью, в ее состав входит от 80 до 100 млн. нейронов (как и в спинном мозге). Многие кишечные нейроны являются пептидергическими и вместе с адренергическими и холинергическими нейронами, а также в сотрудничестве с АПУД-системой (расположенными одиночно и группами апудоцитами – эндокринными клетками, продуцирующими биогенные амины) и клетками иммунной системы способны принимать, дешифровать, анализировать и передавать информацию от антигенов содержимого кишечника (в значительной мере отражающего антигенный состав микроорганизмов, а следовательно, и свойства окружающего мира) в вышестоящие отделы централизованного аппарата управления, в том числе и головной мозг.

Эволюционно обусловленная общность сигнальных молекул и рецепторов к ним в нервной, эндокринной, иммунной системах кишеч-

ника и в компонентах микросимбиоза обеспечивает регулирование адаптивных возможностей макроорганизма в ответ на «агрессию» антигенов. При этом антиген, распознаваемый рецепторами иммунной системы как генетически чужеродный, вызывает активацию не только иммунной, но и нервной и эндокринной систем, которые по принципу обратной связи могут усилить или ослабить иммунный ответ.

Таким образом, возникающая в ходе эволюции система микросимбиоза у животных может в значительной мере изменять состав нутриентов, образующихся в желудочно-кишечном тракте из питательных и балластных веществ пищи, а также участвовать (в основном облигатная микрофлора) в создании первого адаптационного уровня защиты макроорганизма.

Участие микробиоценоза в адаптации макроорганизма к условиям среды обеспечивается тем, что облигатная микрофлора способна:

- выступать в качестве активного «буфера», оказывая регуляторное влияние на транзитную микрофлору, уменьшая тем самым воздействие среды на организм;
- являться физиологическим активатором иммунной системы, поддерживая необходимый уровень ее активности;
- быть преобразователем сигналов окружающего мира путем приема информации от транзитной микрофлоры, реализации ее на уровне микробиоценоза и симбиоза с последующей передачей информации через иммунную систему в централизованный аппарат управления.

Как известно, важная роль в интегрировании нейроэндокринно-иммунной регуляции метаболизма, гомеостаза и адаптации у высших животных принадлежит гипоталамо-гипофизарной системе. При этом индивидуальный микробный фенотип контролируется иммунной системой в зависимости от характера сигналов микробных ассоциаций микробиоценозов пищеварительного тракта и окружающей среды.

19.4. Некоторые аспекты экологической биохимии

Как указано выше, эволюция жизни неразрывна от эволюции Земли, ее атмосферы, от процессов адаптации организмов к меняющимся условиям окружающей среды. При этом для решения в перспективе вопросов управления процессами эволюции необходимо понимание как закономерностей естественной эволюции, так и знание механизмов тех процессов, которые происходят в живых организмах при

появлении (или количественном изменении) новых факторов, в том числе химических веществ.

В связи с общностью многих универсальных блоков, в том числе регуляторных (различных информонов и рецепторов к ним), у организмов, находящихся на различных ступенях эволюционной лестницы, возникает необходимость достаточно полного научного обоснования различных антропогенных вмешательств, в частности, применения пестицидов, инсектицидов, гербицидов, лекарственных средств, стимуляторов роста животных и растений.

К настоящему времени раскрыты молекулярные механизмы действия на организм человека и животных многих физических, химических и биологических факторов, в том числе таких ядовитых веществ, как цианиды, хлорорганические пестициды – ДДТ (4,4'-дихлордифенилтрихлорметилметан) и диоксины (ТХДД – 2,3,7,8-тетрахлордibenзопарадиоксин и др.), бензпирены, дибензантрацены и др.

Цианиды являются ингибиторами цитохромоксидазы и поэтому обладают токсическим эффектом в отношении тех организмов, у которых цитохромоксидазный блок является терминальным компонентом электронтранспортной цепи переноса электронов на кислород.

ДДТ – наиболее эффективный инсектицид (против вшей, клопов, малярийного комара и др.), который, как казалось вначале, обладает токсическим эффектом избирательно только на насекомых, у которых были открыты пуринаергические и аминацидергические нервы, наиболее чувствительные к ДДТ. Изучение появившихся у человека и животных токсических эффектов при использовании ДДТ привело к открытию у них аналогичных типов иннерваций (пуринаергических и аминацидергических нервов), ранее неизвестных для человека и животных функциональных блоков [16]. Таким образом, механизм токсического эффекта ДДТ у животных такой же, как у насекомых. ДДТ запрещен к использованию в России и многих других странах, но в связи с высокой устойчивостью (выдерживает нагревание до 150-170° и выше, в почве сохраняет свои свойства в течение 30 лет) он до сих пор существует в природе и поступает в организм человека и животных по пищевым цепям.

Диоксины в настоящее время относят к числу наиболее распространенных экотоксинов [29]. В почве они могут сохраняться 15 лет без потери токсических свойств.

Главным источником поступления диоксинов в окружающую среду являются полихлорированные бифенилы, в которых диоксины содержатся в качестве примеси. Они также могут быть в выхлопах автомобилей, образовываться при хлорировании воды (если в ней со-

держатся фенолы), при переработке лома черных металлов (если на них имеются лакокрасочные покрытия).

Токсичность диоксинов обусловлена их высоким сродством к Ah-рецептору (Ah – *aromatic hydrocarbonhydroxylase*), через который опосредуется в организме животных и человека большинство биологических эффектов ТХДД. Высокие дозы Ah-рецептора выявлены на многих клетках тимуса, печени, кожи, лейкоцитах, которые и являются мишенями диоксинов.

Ah-рецептор является лигандзависимым протеином, способным связываться с ДНК, активируя гены, находящиеся в норме в репрессированном состоянии. В отсутствие лиганда (некоторых информонов) Ah-рецептор локализован в цитоплазме в виде комплекса с двумя ингибирующими его проникновение в ядро белками. Ah-рецептор функционирует как один из регуляторов транскрипции, взаимодействуя с различными другими регуляторными белками (ингибиторами, киназами, транслоказами, ДНК-связывающими). Модуляторами специфического взаимодействия Ah-рецептора со специфическими участками ДНК являются различные информоны и их рецепторы. Диоксин способен образовывать с Ah-рецептором высокопрочный активированный комплекс, продолжительно функционирующий в клетке как гормон, многократно активируя определенные участки ДНК (Ah-локусы), которые в свою очередь дерепрессируют другие гены. В результате индуцируется синтез комплекса ферментов (дегидрогеназ, трансфераз, гидроксилаз, цитохромов), катализирующих многочисленные реакции обмена веществ, в том числе окисление различных ароматических соединений, активизацию предшественников мутагенов, канцерогенов, образование нейро- и иммунотоксичных веществ, свободных радикалов, супероксиданионов, пероксида водорода. Как следствие, возможно окисление липидов мембран, локальные изменения их структуры и даже полное нарушение метаболизма клетки [29].

Бензпирены и дибензантрацены также выступают в качестве лигандов к Ah-рецепторам, вызывая в организме животных и человека сходные с диоксинами эффекты, но с менее выраженными повреждениями, появляющимися при их длительном поступлении в организм.

Следует обратить внимание на то, что в настоящее время отмечается обострение симбиотических взаимоотношений между макро- и микроорганизмами в микросимбиозах, сложившихся в ходе длительной эволюции.

Химические (пестициды, антибиотики, иммунодепрессанты, соли тяжелых металлов и др.), физические (ионизирующие излучения) и биологические (вирусы, бактерии, паразиты) факторы могут вызы-

вать в желудочно-кишечном тракте человека и животных глубокие количественные и качественные изменения микробного биоценоза, сложившегося в ходе эволюции. Эти нарушения пищеварительных и иммунных процессов в желудочно-кишечном тракте принято называть кишечным дисбактериозом (дисбиозом). При дисбактериозе происходит уменьшение или исчезновение бифидобактерий, увеличение транзитных симбионтов (эшерихий, энтерококков, клебсиелл, клостридий, протей, стафилококков, дрожжевых грибов и др.), появление штаммов с гемолитической активностью и другими патогенными свойствами. При этом значительно повышается функциональная нагрузка на иммунную систему, нарушается взаимодействие IgA и IgG с энтероцитами, происходит выделение значительного количества белков (ферментов и антител) с калом. Одновременно в кишечнике происходит декарбоксилирование пищевых аминокислот с образованием повышенного количества биогенных аминов и других токсических веществ. Бактериальные токсины, постоянно и мощно стимулируя аденилатциклазную активность энтероцитов, усиливают и истощают кишечную секрецию, изменяют проницаемость стенки кишечника, отрицательно влияют на метаболические процессы в организме, на функции различных клеток и тканей.

Дисбактериозы, вызываемые различными факторами, существенно нарушают прямые и обратные связи в механизмах эволюционно возникших системных и межсистемных взаимодействий, осуществляемых при участии нейроэндокринноиммунных кишечных пептидов и других информонов.

Итак, возрастающее влияние многочисленных, в том числе и антропогенных, негативных факторов окружающей среды на отдельные живые организмы непосредственно – путем нарушения структуры и функции различных органов и тканей, регуляции метаболических процессов, а также опосредованно – через изменения видового состава макро- и микробиоценозов, свидетельствует о необходимости дальнейшего изучения сложившейся на Земле экологической ситуации и принятию научно обоснованных мер по предотвращению экологической катастрофы.

Глава 1

1. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т.1. 367 с.
2. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2003. 376 с.
3. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. 551 с.
4. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: НИИБМФ, 1999. 372 с.
5. Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. М.: Мир, 1987. 544 с.
6. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.
7. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М.: Изд-во «Агар», 1999. 512 с.

Глава 2

1. Дубинина Е.Е. Некоторые особенности функционирования ферментативной антиоксидантной защиты плазмы крови человека // Биохимия. 1993. Т.58. Вып.2. С.268-272.
2. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи совр. биол. 1993. Т.113. Вып.3. С.286-294.
3. Колодзейская М.В. Сериновые протеиназы низших позвоночных (обзор) // Укр. биохим. журн.1986. Т.58, №2. С. 90 -101.
4. Курганов Б.И. Физико-химические механизмы регуляции активности ферментов. М.: Наука, 1992. 60 с.
5. Лизосомы: Методы исследования / Под ред. Дж. Дингла. М.: Мир, 1980. С.100-156.
6. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. В 2 т. Т.1. М.: Мир, 1993. 381 с.
7. Мецлер Д. Биохимия: В 3 т. Т.2. М.: Мир, 1980. 605 с.
8. Розанов А.Я. Механизмы регуляции биокатализа. Киев: Выща школа, 1989. 239 с.
9. Сологуб Л.И., Пашковская И.С. Са²⁺-активируемые нейтральные протеиназы клеток животных и человека // Успехи совр. биол. 1988. Вып. 2. С. 3-15.
10. Соловьева Н.И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции // Биоорганическая химия. 1998. Т.24. №4. С.245-261.
11. Поглазов Б.Ф. Организация биохимических систем // Биохимия. 1996. Т. 61. Вып. 11. С. 1941-1947.

12.Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы. М.: Мир, 1986. 374 с.

13.Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: Изд-во НИИ биомедицинской химии РАМН, 1999. 372 с.

Глава 3

1. Анисимов А.А. Основы биохимии. М.: Высшая школа, 1986. С. 309-338.

2. Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М.: Изд-во МГУ, 1992. С. 30.

3. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 3 т. Т. 1. М.: Мир, 1993. С. 140-150.

4. Мецлер Д. Биохимия: В 3 т. Т. 1. М.: Мир, 1980. С. 106-118.

5. Степаненко Б.Н. Химия и биохимия углеводов (полисахариды). М.: Высшая школа, 1978. 256 с.

Глава 4

1. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. 551 с.

2. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.

3. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т. 3. 320 с.

4. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2003. 544 с.

5. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: НИИБМФ, 1999. 372 с.

6. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М.: Изд-во «Агар», 1999. 512 с.

7. Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. М.: Мир, 1987. 544 с.

Глава 5

1. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т.1. 367 с.

2. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. 551 с.

3. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: НИИБМФ, 1999. 372 с.

4. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М.: Изд-во «Агар», 1999. 512 с.

5. Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. М.: Мир, 1987. 544 с.

6. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.

Глава 6

1. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1985. 320 с.
2. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. М.: Медицина, 2002. 704 с.
3. Фролов Ю.П., Серых М.М., Инюшкин А.Н., Чепурнов С.А. Управление биологическими системами. Организменный уровень / Под ред. Ю.П. Фролова. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2001. 318 с.
4. Розен В.Б. Основы эндокринологии. М.: Изд-во МГУ, 1994. 384 с.
5. Лейкок Дж. Ф., Вайс П.Г. Основы эндокринологии / Пер. с англ. М.: Медицина, 2000. 504 с.

Глава 7

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. М.: Медицина, 2002. 704 с.
2. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача. Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994. 384 с.
3. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т. Т. 3. М.: Мир, 1985. 320 с.

Глава 8

1. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т. М.: Мир, 1985. 1056 с.
2. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М.: Изд-во «Агар», 1999. 512 с.
3. Биохимия / Под ред. Е.С. Северина, А.Я. Николаева. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. 408 с.
4. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 1988. 704 с.
5. Страйер Л. Биохимия: В 3 т. Т.2. М.: Мир, 1985. 312 с.
6. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т. М.: Мир, 1993. 799 с.
7. Зайчик А.Ш., Чуринов Л.П. Основы патохимии. СПб.: ЭЛБИ, 2000. 688 с.
8. Мецлер Д. Биохимия: В 3 т. Т.3. М.: Мир, 1980. 488 с.

Глава 9

1. Курганов Б.И. Физико-химические механизмы регуляции активности ферментов. М.: Наука, 1992. 59 с.
2. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т. Т.1. М.: Мир, 1993. 381 с.
3. Мецлер Д. Биохимия: В 3 т. Т. 2: Химические реакции в живой клетке. М.: Мир, 1980. 605 с.
4. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: Изд-во НИИ биомедицинской химии РАМН, 1999. 372 с.

Глава 10

1. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. 551 с.
2. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М.: Изд-во «Агар», 1999. 512 с.
3. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т. 3. 320 с.
4. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: НИИБМФ, 1999. 372 с.

Глава 11

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник. М.: Медицина, 2002. 704 с.
2. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача. Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994. 384 с.
3. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3 т. Т. 2. М.: Мир, 1985. 368 с.
4. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т. Т. 1 / Пер. с англ. М.: Мир, 1993. 384 с.
5. Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: ООО «Мед. информ. агентство», 1998. 496 с.

Глава 12

1. Бойер П.Д. На пути к пониманию каталитического механизма АТР-синтазы // Биохимия. 2001. Т. 66. Вып.10. С.1312-1322.
2. Виноградов А.Д. Преобразование энергии в митохондриях // Соровский образовательный журнал. 1999. № 9. С.11-20.
3. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т. Т.1. М.: Мир, 1993. С.127-139.
4. Скулачев В.П. Биознергетика. Мембранные преобразователи энергии. М.: Высшая школа, 1989. 270 с.
5. Тихонов А.Н. Молекулярные моторы. Ч.1: Вращающиеся моторы живой клетки // Соровский образовательный журнал. 1999. № 6. С. 8-16.
6. Тихонов А.Н. Трансформация энергии в хлоропластах – энергопреобразующих органеллах растительной клетки // Соровский образовательный журнал. 1996. № 4. С. 24-33.
7. Тихонов А.Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза // Соровский образовательный журнал. 1999. № 11. С. 8-16.
8. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: Изд-во НИИ биомедицинской химии РАМН, 1999. С. 101-109.

Глава 13

1. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1985. Т. 2. 325 с.
2. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т. Т. 1. М.: Мир, 1993. 380 с.
3. Мецлер Д. Биохимия: В 3 т. Т. 2. М.: Мир, 1980. 597 с.

Глава 14

1. Диксон М., Узбб Э. Ферменты: В 3 т. М.: Мир, 1982. 1118 с.
2. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1979. 280 с.
3. Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 1990. 348 с.
4. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977. 280 с.
5. Волькенштейн М.В. Биофизика. М.: Наука, 1981. 575 с.
6. Бреслер С.Е. Молекулярная биология. Л.: Наука, 1973. 578 с.
7. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. 551 с.
8. Кретович В.Л. Введение в энзимологию. М.: Наука, 1986. 332 с.
9. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка. М.: Книжный дом «Университет», 2002. 376 с.
10. Бауэр Э.С. Теоретическая биология. СПб.: ООО «Росток», 2002 (1935). 352 с.

Глава 15

1. Мушамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2003. 544 с.
2. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т.2. 325 с.
3. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М.: Изд-во «Агар», 1999. 512 с.
4. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. 551 с.
5. Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. М.: Мир, 1987. 544 с.
6. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.
7. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: НИИБМФ, 1999. 372 с.

Глава 16

1. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. М.: НИИБМФ, 1999. 372 с.

2. Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. М.: Мир, 1987. 544 с.
3. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.
4. Основы биохимии / Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. 551 с.
5. Мушкамбаров Н.Н., Кузнецов С.Л. Молекулярная биология. М.: ООО «Мед. информ. агентство», 2003. 544 с.
6. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т. 2. 325 с.

Глава 17

1. Волькенштейн М.В. Биофизика. М.: Наука, 1981. 575 с.
2. Гурфинкель В.С., Левик Ю.С. Скелетная мышца: Структура и функция. М.: Наука, 1985. 144 с.
3. Шубникова Е.А., Юрина Н.А., Гусь Н.Б., Балезина О.П., Большакова Г.Б. Мышечные ткани. М.: Медицина, 2001. 240 с.
4. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. Т.2. М.: Мир, 1993. 415 с.
5. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. Т. 2. М.: Мир, 1994. 539 с.
6. Костюк П.Г. Кальций и клеточная возбудимость. М.: Наука, 1986.
7. Агаджанян Н.А., Тель Л.З., Циркин В.И., Чеснокова С.А. Физиология человека. М.: Медицинская книга; Н.Новгород: Изд-во НГМА, 2001. 526 с.
8. Бреслер С.Е. Молекулярная биология. Л.: Наука, 1973. 577 с.
9. Дещеревский В.И. Математические модели мышечного сокращения. М.: Наука, 1977. 160 с.
- 10.Энгельгардт В.А. Познание явлений жизни. М.: Наука, 1984. 304 с.
- 11.Калинин Ф.Л. Основы молекулярной биологии. Киев: Вища школа, 1978. 488 с.
- 12.Бэгшоу К. Мышечное сокращение. М.: Мир, 1985. 128 с.
- 13.Букатина А.Е. Механохимия поперечнополосатой мышцы // Биохимия и биофизика мышц. М.: Наука, 1983. С.54-62.
- 14.Волькенштейн М.В. Физика и биофизика. М., 1980. 152 с.
- 15.Шноль С.Э. Герои, злодеи, конформисты российской науки. М.: КРОН-ПРЕСС, 2001. 875 с.
- 16.Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: ООО «Мед. информ. агентство», 1998. 496 с.

Глава 18

1. Опарин А.И. Происхождение жизни. М.: Московский рабочий, 1924.
2. Опарин А.И. Возникновение жизни на Земле. М.: Госмедиздат, 1936; М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1941, 267 с.; М.: Изд-во АН СССР, 1957. 458 с.
3. Бернал Дж. Возникновение жизни. М.: Мир, 1969.
4. Фролов Ю.П. Неконтактное действие бензойных соединений на биологические системы. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2000. 84 с.
5. Возникновение жизни на Земле / Труды Международного симпозиума 19-24 августа 1957 г., Москва. М.: АН СССР, 1959. 671 с.
6. Энгельгардт В.А. Проблема жизни в современном естествознании // Коммунист. 1969. №3. С. 83-95 (цит. по [7]).
7. Энгельгардт В.А. Познание явлений жизни. М.: Наука, 1984. 304 с.
8. Жданов В.М. Эволюция вирусов. М.: Медицина, 1990. 376 с.
9. Бакулин П.И., Кононович Э.В., Мороз В.И. Курс общей астрономии. М.: Наука, 1983. 560 с.
10. Чарыгин М.М. Общая геология. М.: Гостолтехиздат, 1959. 390 с.
11. Фокс С., Дозе К. Молекулярная эволюция и возникновение жизни. М.: Мир, 1975. 374 с.
12. Фесенков В. Первичное состояние нашей планеты / Труды Международного симпозиума «Возникновение жизни на Земле». М.: Изд-во АН СССР, 1959. С.13-19.
13. Симионеску К., Денеш Ф. Происхождение жизни. Химические теории. М.: Мир, 1986. 120 с.
14. Кальвин М. Химическая эволюция. М.: Мир, 1971. 240 с.
15. Опарин А.И. Происхождение и эволюция обмена веществ/ Труды V Международного биохимического конгресса. Симпозиум III: Эволюционная биохимия. М.: Изд-во АН СССР, 1962. С. 74-90.
16. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. 815 с.
17. Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки. Т. 1. М.: Мир, 1994. 517 с.
18. Бьернсон Л., Леммон Р., Кальвин М. Реакции конденсации лигана в присутствии полиадениловой кислоты // Происхождение жизни и эволюционная биохимия. М.: Наука, 1975. С. 22-26.
19. Фолсом К. Происхождение жизни. М.: Мир, 1982. 160 с.

20. Уголев А.М. Функциональная эволюция и гипотеза функциональных блоков // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1983. Т.19. №4. С. 390-399.

21. Уголев А.М. Концепция универсальных функциональных блоков и дальнейшее развитие учений о биосфере, экосистемах и биологических адаптациях // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1990. Т. 26. № 4. С. 441-454.

22. Уголев А.М. Теория адекватного питания и трофология. Л.: Наука, 1991. 272 с.

23. Фролов Ю.П. Введение в математическое моделирование биологических процессов. Часть 1: Молекулы и клетки. Самара: Изд-во «Самарский университет», 1992. 426 с.

24. Свенсон К., Узбстер П. Клетка. М.: Мир, 1980. 303 с.

25. Фролов Ю.П., Серых М.М. Управление биологическими системами. Клеточный уровень. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2000. 116 с.

26. Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука, 1985. 544 с.

27. Эйген М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул. М.: Мир, 1976.

28. Эйген М., Винклер Р. Игра жизни. М.: Наука, 1979. 94 с.

29. Эйген М., Шустер П. Гиперцикл: принципы самоорганизации макромолекул. М.: Мир, 1982. 270 с.

30. Каствлер Г. Возникновение биологической организации. М.: Мир, 1967. 90 с.

31. Кузин А.М. Природный радиоактивный фон и его значение для биосферы Земли. М.: Наука, 1991. 117 с.

Глава 19

1. Евреинова Т.Н. Коацерватные системы и происхождение жизни // Эволюционная биохимия. М.: Знание, 1973. С. 12-20.

2. Спирин А.С., Гаврилова Л.П. «Энзиматическая» и «неэнзиматическая» трансляция // Эволюционная биохимия. М.: Знание, 1973. С. 55-64.

3. Шелерд Г. Нейробиология: В 2 т. Т. 1 / Пер. с англ. М.: Мир, 1987. 487 с.

4. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: В 3 т. Т. 1 / Пер. с англ. М.: Мир, 1994. 517 с.

5. Диксон М., Узбб Э. Ферменты: В 3 т. Т.1 / Пер. с англ. М.: Мир, 1977. 320 с.

6. Шавиль Ф., Энни А. Биосинтез белка / Пер. с франц. М.: Мир, 1977. 320 с.
7. Франк-Каменецкий М.Д. Самая главная молекула. М.: Наука, 1988. 176 с.
8. Рэфф Р., Кофмен Т. Эмбрионы, гены и эволюция / Пер. с англ. М.: Мир, 1986. 404 с.
9. Жизневская Г.Я. Проблемы молекулярной эволюции // Успехи современной биологии. 1980. Т. 89. Вып. 1. С. 3-15.
10. Георгиев Г.П. Мобильные гены животных // Наука и человечество. М.: Знание, 1985. С. 169-181.
11. Льюин Б. Гены / Пер. с англ. М.: Мир, 1987. 544 с.
12. Страйер Л. Биохимия: В 3 т. Т. 3 / Пер. с англ. М.: Мир, 1985. 400 с.
13. Доман М.Г., Феденко Е.П. Биологическая роль циклического АМФ // Успехи биол. химии. Т.17. М.: Наука, 1976. С. 63-101.
14. Крю Ж. Биохимия. М.: Медицина, 1979. 510 с.
15. Юдаев Н.А., Афиногенова С.А., Покровский Б.В., Протасова Т.Н. Циклические нуклеотиды как внутриклеточные передатчики действия гормонов // Успехи соврем. биологии. Т. 80. Вып. 3 (6). 1975. С. 351-370.
16. Уголев А.М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука, 1985. 544 с.
17. Уголев А.М., Ратбель О.С. Гормоны пищеварительной системы. М.: Наука, 1995. 283 с.
18. Ткачук В.А. Введение в молекулярную эндокринологию. М.: Изд-во МГУ, 1983. 256 с.
19. Нестерова М.В., Соломония Р.О., Северин Е.С. Циклические нуклеотиды в регуляции процессов клеточного деления // Успехи биологической химии. Т. 22. М.: Наука, 1982. С. 63-75.
20. Оленев Ю.М. Проблемы молекулярной генетики. Л.: Наука, 1977. 204 с.
21. Мецлер Д. Биохимия: В 3 т. Т. 3 / Пер. с англ. М.: Мир, 1980. 478 с.
22. Грин Н., Скаут У., Тейлор Д. Биология: В 3 т. Т.2 / Пер. с англ. М.: Мир, 1993. 325 с.
23. Фролов Ю.П., Серых М.М., Инюшкин А.Н., Челурнов С.А. Управление биологическими системами. Организменный уровень / Под ред. Ю.П. Фролова. Самара: Изд-во «Самарский университет», 2001. 318 с.
24. Розен В.Б. Основы эндокринологии. М.: Изд-во МГУ, 1994. 384 с.
25. Крыжановский Г.Н., Мачаева С.В., Макаров С.В. Нейроиммунопатология. М., 1997. 283 с.

26. Балаболкин М.И. Эндокринология. М.: Универсум паблишинг, 1998. 584 с.
27. Воронин Е.С., Петров А.М., Серых М.М., Девришов Д. Иммунология. М.: Колос-Пресс, 2002. 408 с.
28. Бурмистрова А.Л. Иммунный гомеостаз и микросимбиоз. Метаморфозы и пути развития воспалительных заболеваний кишечника. Челябинск: Изд-во «Челябинский дом печати», 1997. 216 с.
29. Иммунодефицитные состояния / Ред. В.В. Смирнов, И.С. Фрейдлин. СПб.: Фолиант, 2000. 586 с.
30. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина, 2000. 432 с.
- 31 Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 608 с.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ (Фролов Ю.П.)	3
ВВЕДЕНИЕ (Серых М.М.)	5
 РАЗДЕЛ ПЕРВЫЙ. СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИИ БИОМОЛЕКУЛ	
Особенности химического состава организмов (Фролов Ю.П.)	12
 Глава первая. Белки (Макурина О.Н.)	16
1.1. Общая характеристика	16
1.2. Строение и свойства аминокислот	17
1.3. Строение белковой молекулы	26
1.4. Простые и сложные белки	40
1.5. Функции белков	44
1.6. Свойства белков	47
 Глава вторая. Ферменты (Кленова Н.А.)	51
2.1. Химическая природа ферментов	51
2.2. Классификация ферментов	60
2.3. Регуляция активности ферментов	66
 Глава третья. Углеводы (Кленова Н.А.)	74
3.1. Моносахариды	74
3.2. Дисахариды	79
3.3. Олигосахариды	81
3.4. Полисахариды	82
3.5. Пептидогликаны и гликопротеиды	87
 Глава четвертая. Нуклеиновые кислоты (Макурина О.Н.)	89
4.1. Общая характеристика строения нуклеиновых кислот.	89
4.2. Строение ДНК.....	95
4.3. Строение РНК.....	103
 Глава пятая. Липиды (Макурина О.Н.)	112
5.1. Классификация липидов.....	112
5.2. Роль липидов в питании.....	126
 Глава шестая. Гормоны (Подковкин В.Г.)	127
6.1. Общая характеристика гормонов.....	127
6.2. Рецепция гормонов.....	136

Глава седьмая. Витамины и микроэлементы (Подковкин В.Г.)	143
7.1. Водорастворимые витамины	143
7.2. Жирорастворимые витамины	147
7.3. Антивитамины	149
7.4. Микроэлементы	149

РАЗДЕЛ ВТОРОЙ. МЕТАБОЛИЗМ И БИОЭНЕРГЕТИКА
Особенности химических превращений в биосистемах

(Фролов Ю.П.)	152
----------------------------	------------

Глава восьмая. Метаболизм белков (Серых М.М.)	154
8.1. Круговорот азота в биосфере	154
8.2. Включение аммиака в аминокислоты и белки. Образование аминокислот в организме животных	156
8.3. Фонд свободных аминокислот	158
8.4. Ферментативный гидролиз белков	161
8.5. Превращения аминокислот в организме	168
8.6. Образование, транспорт и пути выделения аммиака из организма	170
8.7. Биосинтез мочевины	173
8.8. Нарушения структуры и обмена белков. Наследственные заболевания	177
8.9. Азотистые небелковые вещества, их синтез, распад и биологическая роль	181
8.10. Алкалоиды, их роль у растений и значение в медицине	199

Глава девятая. Метаболизм углеводов (Кленова Н.А.)	206
9.1. Гликогенолиз	206
9.2. Катаболизм моносахаридов	209
9.3. Пути превращения пировиноградной кислоты	215
9.4. Энергетический выход и регуляция цикла трикарбоновых кислот. Сопряжение с процессом гликолиза	219
9.5. Глюконеогенез. Гликогеногенез	223
9.6. Пентозофосфатный путь окисления глюкозы	226

Глава десятая. Метаболизм нуклеотидов (Макурина О.Н.) ...	230
10.1. Биосинтез нуклеотидов	230
10.2. Распад пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов	239

Глава одиннадцатая. Метаболизм липидов (Подковкин В.Г.)	242
11.1. Переваривание и всасывание липидов	242
11.2. Окисление жирных кислот	245
11.3. Кетоновые тела	248
11.4. Регуляция окисления жирных кислот и образования кетоновых тел	250
11.5. Биосинтез высших жирных кислот	251
11.6. Биосинтез жиров	254
11.7. Превращения глицерола в тканях	257
Глава двенадцатая. Биоэнергетика (Кленова Н.А.)	258
12.1. Макроэргические соединения	258
12.2. Субстратное фосфорилирование	263
12.3. Окислительное фосфорилирование	264
12.4. Фотосинтез	277
Глава тринадцатая. Взаимосвязь процессов метаболизма углеводов, липидов и белков (Кленова Н.А.)	281
13.1. Взаимосвязь процессов метаболизма	281
13.2. Регуляция направления метаболических процессов	287
13.3. Взаимное превращение основных питательных веществ в животных клетках	291
РАЗДЕЛ ТРЕТИЙ. ЭЛЕМЕНТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ	
Предмет и задачи молекулярной биологии (Фролов Ю.П.) ...	294
Глава четырнадцатая. Молекулярные механизмы ферментативного катализа (Фролов Ю.П.)	298
14.1. Общие сведения о катализе	298
14.2. Методы исследования молекулярного механизма ферментативного катализа	299
14.3. Элементы ферментативной кинетики	301
14.4. Термодинамические аспекты катализа	309
14.5. Физико-химические механизмы ферментативного катализа	314
Глава пятнадцатая. Молекулярные механизмы матричных синтезов (Макурина О.Н.)	319
15.1. Репликация ДНК	319
15.2. Синтез РНК (транскрипция ДНК)	327
15.3. Биосинтез белка	337

Глава шестнадцатая. Структурно-функциональная организация биомембран (Макурина О.Н.)	358
16.1. Строение мембран	358
16.2. Функции мембран	363
Глава семнадцатая. Молекулярные механизмы сокращения мышц (Серых М.М., Фролов Ю.П.)	366
17.1. Двигательные функции биосистем	366
17.2. Структура мышц и мышечных волокон	368
17.3. Механизм мышечного сокращения	377
17.4. Регуляция мышечного сокращения	383
РАЗДЕЛ ЧЕТВЕРТЫЙ. ИЗБРАННЫЕ ГЛАВЫ	
ЭВОЛЮЦИОННОЙ БИОХИМИИ	
Особенности эволюции биосистем в период их становления (Фролов Ю.П.)	385
Глава восемнадцатая. Возникновение жизни на Земле: молекулярный аспект (Фролов Ю.П.)	389
18.1. История вопроса	389
18.2. Живая материя и ее критерии	392
18.3. Происхождение Земли и Солнечной системы	394
18.4. Физико-химические условия на первобытной Земле.....	397
18.5. Лабораторное моделирование начального этапа возникновения жизни на Земле	403
18.6. Образование макромолекул	412
18.7. Формирование биохимического обмена веществ и протоклеток	422
18.8. От протоклеток – к современным клеткам	428
Глава девятнадцатая. Некоторые вопросы эволюции биохимических процессов и механизмов их регуляции (Серых М.М.)	435
19.1. Эволюция нуклеиновых кислот и белков	438
19.2. Эволюция метаболических процессов и механизмов их регуляции	455
19.3. Взаимосвязь эволюции регуляторных молекул и взаимоотношений между макро- и микроорганизмами в биосимбиозах	478
19.4. Некоторые аспекты экологической биохимии	483
Библиографический список	487

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ



Фролов Юрий Павлович,
заведующий кафедрой
биохимии, профессор



Серых Милон Матвеевич,
доктор биологических наук,
профессор



Макурина Ольга Николаевна,
доктор биологических наук,
профессор



Кленова Наталья
Анатольевна, доктор
биологических наук, доцент



Подковкин Владимир Георгиевич,
доктор биологических наук, профессор