ХИМИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

БИОХИМИЯ

ГЛАДИЛИН
АЛЕКСАНДР КИРИЛЛОВИЧ

ХИМФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ. СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ НА VK.COM/TEACHINMSU.

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ, ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ, НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ VK.COM/TEACHINMSU.

Оглавление

Лекция 1. Термодинамика стабильности белков 7
Стабильность белков in vivo 7
Термодинамическая стабильность 8
Взаимосвязь структуры и стабильности 8
Молекулярные причины термодинамической стабильности 9
Необратимая инактивация 10
Механизмы необратимой инактивации 10
Лекция 2. Механизмы необратимой инактивации. (Продолжение) 12
Методы выделения и очистки 13
1. Постановка задачи 13
2. Гомогенизация 13
3. Меры предосторожности 14
4. Грубая экстракция 15
Лекция 3. Методы очистки и выделения белков. (Продолжение) 16
5. Осаждения. 16
Первый метод – изоэлектрическое осаждение. 16
Второй метод – высаливание. 16
Третий метод – осаждение под действием температуры 18
Четвертый метод – осаждение изменением pH 18
Пятый метод – органический растворитель 18
6. Хроматография 19
Основные компоненты хроматографической системы 19
Природа сродства 20
Лекция 4. Методы очистки и выделения белков. Круговорот веществ в природе 23
Ионообменная хроматография 23
Электрофоретические методы 25
Основы биохимии 27
Круговорот углерода в биосфере 27
Круговорот азота в природе 27
Лекция 5. Метаболизм 28

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Типы процессов: ... 28
Регуляция реализуется на трех уровнях: ... 28
Гидролиз АТФ ... 30
Пример высокоэнергетических соединений ... 31
Лекция 6. Биохимическое дыхание ... 35
Глюконеогенез ... 38
Лекция 7. Липиды и мембраны ... 41
Классификация липидов ... 41
Две системы обозначения ... 43
Сфинголипиды ... 45
Холестерин ... 47
Биомембраны ... 47
Типы транспорта ... 48
Лекция 8. Регуляция гликолиза ... 50
Манноза ... 52
Фруктоза ... 52
Два механизма для работы мутазы ... 53
Лекция 9. Бактерии и археи ... 57
Эукариоты и археи ... 59
Органеллы клетки ... 60
Транспорт белка в ЭПР ... 61
Фолдинг белка в ЭПР ... 62
Транспорт из ЭПР в Аппарат Гольджи ... 63
Лекция 10. Гликоген ... 68
Гликогенфосфорилаза ... 68
Глюкагон ... 70
Лекция 11. Механизм ... 76
Цикл трикарбоновых кислот ... 77
Локализация в клетке ... 79
Регуляция ... 80
Лекция 12. Точки входа в цикле трикарбоновых кислот ... 81
Глиоксалатный цикл ... 82

Лекция 13. Пентофосфотазный путь ... 88
Полный путь до воды и углекислого газа ... 90
Основные окислительно-восстановительные этапы ... 90
Цитохромы ... 92
Лекция 14. Синтез АТФ ... 94
Хемиосмотическая теория ... 94
Лекция 15. Гликолиз ... 100
Глюконеогенез ... 101
Первый обходной путь ... 101
Второй обходной путь ... 101
Третий обходной путь ... 102
Лекция 16. Жиры ... 104
Этапы переработки жирных кислот ... 104
Лекция 17. Кетоновые тела ... 109
Анаболизм жирных кислот ... 110
Синтез пальмитиновой кислоты ... 111
Ферменты: ... 111
Глицерин ... 112
Лекция 18. Синтез липидов ... 113
Регуляция ... 114
Стратегии синтеза фосфолипид ... 116
1 стратегия для прокариотов: ... 116
1 стратегия для эукариотов: ... 117
2 стратегия для эукариотов: ... 117
Сфинголипиды ... 118
Лекция 19. Белки ... 119
Метаболизм аминокислот ... 119
Метаболизм азота ... 120
Аммиак в организме (NH_4^+) ... 122
Механизмы выведения аммиака из организма ... 122
Синтез мочевины ... 123
Два пути транспортировки аммиака ... 123

Цикл мочевины (орнитиновый цикл) 124

Лекция 20. Метаболизм углеродной части аминокислот 126

Метаболизм маленьких аминокислотных остатков 130

Лекция 21. Аммиак 133

Анаболизм аминокислот 134

Азотистые основания. Катаболизм пуриновых оснований 138

Лекция 22. Анаболизм пуринов 141

Фотосинтез 145

Лекция 23. Фотосинтез 147

Фотосхема для растений 148

Фотосхема для бактерий 149

Лекция 24. Витамины группы В 152

B1 – тиамин 152

B2 – рибофлавин 153

PP - никотинамид 154

B5 – пантотеновая кислота 155

B6 – пиридоксин 155

B12 – цианокобаламин 156

Витамин С – L-аскорбиновая кислота 157

Витамин Р – фолиевая кислота 157

Витамин Н – биотин 157

SAM – фактор роста 158

Карнитин 158

Липоевая кислота 158

Лекция 25. Витамины и гормоны 160

Витамин А – ретинол 160

Витамин D – кальциферол 161

Витамин Е – токоферол, неспецифический антиоксидант. 161

Витамин К – филлохинон 162

Гормоны 163

Адреналин 165

Приложение 167

Лекция 1

Термодинамика стабильности белков

Стабильность белков in vivo

Подавляющее большинство белков живет от 2 до 200 часов с последующей деструкцией до аминокислотных остатков.

Механизмы деградации:

а) Гидролиз под действием тиоловых протеаз в лизосомах (направленное разрушение белка)

б) Под действием Са и АТФ-зависимых протеаз в цитозоле (менее эффективный гидролиз)

в) Через комплекс с убиквитином

Убиквитин – фермент, составляющий 70 остатков аминокислот.

Нет никакой корреляции между стабильностью белков in vivo и их брутто параметрами, такими как: молекулярная масса, форма, значение pI, процент α-спиралей и β-листов, гидрофобность поверхности и т.д.

При определении стабильности (времени жизни) белков важны сигнальные последовательности и локализации белка. Наличие сигнальных последовательностей уменьшает продолжительность жизни белка, а отсутствие увеличивает её.

Пример:

Если в белке есть 3-15 повторений следующих последовательностей аминокислот: Pro-Glu-Thr-Ser (12-60 остатков), то они являются сигнальной последовательностью.

Если на месте N-концевой аминокислоты находится:

- Phe, Leu, Asp, Lys, Arg, то белок живет меньше 3 минут;
- Ile, Gln, Tyr, Gly, то белок живет 3-10 минут
- Met, Ser, Ala, Thr, Val, Glu, то белок живет очень долго (40 минут)

Есть предположения, что белок связывается с убиквитином через N конец, поэтому важна аминокислотная последовательность.

Если белок свободно передвигается в объёме, то он будет жить меньше, чем связанный, например, мембранный белок. Вероятность столкновения свободного белка с протеазой больше, чем прикрепленного. Катализ для свободного протекает по гомогенной схеме, в то время как для прикрепленного, связанного белка это зачастую гетерогенный катализ.

Термодинамическая стабильность

Термодинамическая стабильность – это глубина минимума потенциальной n-мерной поверхности. Определяется энергией, которую надо затратить, чтобы перевести белок в его денатурированную конформацию.

$$N \overset{K}{\rightleftarrows} D$$

Денатурированная форма является неактивной, т. к. активный центр изменил конфигурацию и не может связать субстрат. Необходимо учитывать стабилизирующие и дестабилизирующие вклады энергии по уравнению:

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

$$\Delta G_{\text{стаб}} = 5 \div 15\ \frac{\text{ккал}}{\text{моль}}$$

Взаимосвязь структуры и стабильности

Стратегии подбора ферментов для выявления взаимосвязи структура/активность

1) Произвольный набор ферментов (непродуктивный метод)

Проверяется случайная выборка ферментов, маленькая разница в ΔG и большое различие в структурах. Сложно проследить взаимосвязь.

2) Один и тот же фермент, выделенный из разных мезофильных (живущих при нормальных условиях) организмов (метод не дает полного описания взаимосвязи)

Для таких ферментов меньше различия в структуре, но ΔG все еще маленькое для наглядного результата.

3) Один и тот же фермент из термо- и мезофильных организмов (эффективный метод)

Из-за специфики строения ферментов термофильных организмов разница в ΔG будет большой и можно будет проследить зависимость от температуры.

4) Ненаправленные виды мутации (хороший метод)

Метод заключается в воздействии на организм излучения или химических веществ для проявления мутации. Далее фермент проверяют на стабильность. Эксперимент сложно контролировать и невозможно предсказать результат.

5) Метод сайт – специфического моделирования

Из данных о белке (3D структура, моделирование) делаем предположение о возможной модификации сайта связывания для дополнительных взаимодействий, не мешающим связыванию.

6) Химическая модификация

Не всегда можно предсказать результат, однако, это быстрый и удобный метод. Модификацию можно проводить, гидрофилизуя поверхность, вводя положительный или отрицательный заряд и большие заместители, увеличивая площадь поверхности. Перед модификацией в активный центр вводят субстрат.

Молекулярные причины термодинамической стабильности

1) Солевые мостики

Взаимодействие целочисленных или нецелочисленных противоположно заряженных групп (Lys, Arg N-конца и Asp, Glu C-конца). Если мостик располагается внутри белка, то энергия связи равна -5 ккал/моль, что достаточно хорошо повышает стабильность белка. Например, химотрипсин – размер 25 кДа, 230 аминокислотных остатков и всего 1 солевой мостик, что показывает насколько это редкое явление.

2) Дисульфидные связи

Разрушаются в результате окислительно-восстановительных реакций. Не все белки содержат дисульфидные связи, в основном это секретируемые белки. Энергия связи - -5 ккал/моль. Пример: BPTI – небольшой белок, имеет 3 дисульфидных мостика, химотрипсин – 5 дисульфидных мостиков. Они важны для стабильности, неважны для каталитической активности.

3) Гидрофобные взаимодействия

Чем больше гидрофобные взаимодействия, тем более стабилен белок. Энергия связи приблизительно равна сотням тысяч ккал/моль. Оценивают, рассчитывая logP.

4) Водородные связи

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Энергия связи -3 ккал/моль. Нельзя рассматривать как причину стабилизации из-за того, что они присутствуют и в денатурированной форме.

5) Компактность упаковки

Белки упакованы очень плотно, но имеют полости, заполненные водой (до 25% объема). Необходимо заменить аминокислоту около полости на аминокислоту с большим заместителем для вытеснения воды и увеличения гидрофобных взаимодействий.

6) Наличие лиганды −дополнительная связь

Чаще всего, крепится многоточечно, возникают контакты, поддерживающие нативную конформацию. Сдвигает равновесие в сторону нативной формы.

7) Комплексы с другими белками, липидами и т.д.

Если комплекс с малым числом связи (1-2-3), возможно экранирование участков, подверженных денатурации. Если много связей (порядка 10), то образуется комплекс с многоточечным закреплением, многие элементы разворачивания становятся невозможными.

Необратимая инактивация

Необратимые инактивации делят по молекулярному механизму. Было установлено, что, несмотря на сложность механизма и обилие форм промежуточных конформаций, лишь некоторые реакции протекают медленно и их невозможно зафиксировать. Схема Эринга описывает экспериментально измеряемые точки:

$$N \overset{K}{\rightleftarrows} D \overset{k}{\rightarrow} I$$, где k – константа скорости

Процессу необратимой инактивации предшествует процесс обратимой денатурации.

$$v_{N\to I} = -k_{\text{ин}}[N]$$
$$k_{\text{ин}} = \frac{K}{1+K}k$$

Чтобы получить стабильный биокатализатор, можно влиять на обратимую и необратимую стадию. Лучше влиять на обратимую стадию.

Механизмы необратимой инактивации

1. Агрегация

А) Электростатика

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Вместо внутримолекулярных солевых мостиков образуются межмолекулярные мостики. Условия агрегации: снижение диэлектрической постоянной (замена органического растворителя), количество низкомолекулярного электролита в системе, снижение температуры, pH близкий к pI.

Б) Гидрофобные взаимодействия

Два белка с неполярными областями встречаются и образуют агрегаты. Условия агрегации: увеличение температуры, состав среды (высокое количество высаливающих солей), pH близкий к pI.

В) Межмолекулярные S-S-связи

Условия агрегации: катализаторы тиол-дисульфидного обмена, восстановители и неправильные окислители.

Любой из механизмов агрегации чувствителен к концентрации белка. Чем выше концентрация, тем сильнее проявляется агрегация.

Лекция 2

Механизмы необратимой инактивации. (Продолжение)

1. Агрегация:

А) Электростатические взаимодействия

Б) Гидрофобные взаимодействия

В) Межбелковые S-S связи

2. Изменение системы ковалентных связей

А) Гидролиз пептидных связей

Значим при экстремальных значениях pH, t° и действия протеаз. Последнее наблюдается, если выделенный белок загрязнен протеазами клетки и дальнейшее очищение затруднено. Так как протеазы имеют белковую структуру, для них характерно явление автолиза.

Автолиз – расщепление протеазой самой себя.

Б) Восстановление S-S связи агентами тиол-дисульфидного обмена

Если в системе присутствуют восстановители.

В) Модификация остатков цистеина при реакции с окислителями и тяжелыми металлами.

Г) D/L – рацемизация аминокислот

Д) Дезаминирование аспарагина и глутамина

Е) Фосфорилирование и дефосфорилирование

3. Диссоциация кофактора

Кофермент работает с глобулами ферментов, они не закреплены на ферменте и двигаются в объёме, видоизменяясь.

Кофактор прочно связан с глобулой, часто входит в активный центр. Без кофактора фермент не работает.

Способствуют инактивации: хелатирующие агенты, экстремальные значения pH и t° (опосредованная необратимая инактивация).

4. Диссоциация олигомерного фермента на субъединицы

При нормальных условиях разобранный белок может собраться обратно в олигомер, но если образуются мицеллы или есть жесткие условия среды, то инактивация необратима.

Способствуют экстремальные значения pH, t°, мочевина и высокая ионная сила (I).

5. Сорбция на стенках реакционного сосуда

6. «Необратимые» конформационные изменения

Реализуется при резком охлаждении белка в денатурированном состоянии. Замораживается конформация белка, и он становится неактивным, но можно аккуратно повысить температуру и снова медленно охладить, белок вернется в нативную форму. Поэтому чаще говорят о кинетически необратимых конформационных изменениях.

Сохранения белков в нативной форме входит в сферу интересов биомедицины и биотехнологии. Основная задача получить высокостабильный, долго работающий препарат фермента на основе понимания инактивационных процессов.

Методы выделения и очистки

1. Постановка задачи

Надо четко представлять цели и искать решение. Например, необходимо выделить белок заданной активности, для этого надо осознано подходить к выбору сырья. Лучше всего брать растительное, возобновляемое сырье или побочные продукты животноводства, как достаточно дешевые и практичные объекты. Необходимо чётко видеть конечные цели применения препарата. Аккуратно планировать проведение эксперимента. Хорошо представлять, что за фермент с точки зрения локализации в клетке (секретируемые, внутриклеточные и мембранные). Проще всего использовать секретируемые ферменты, которые выделяются клеткой в питательную среду, его экстрагируют и очищают. Если белок не секретируемый, то необходимо разрушить клеточную стенку.

Клеточные стенки различаются по строению: у бактерий довольно прочная стенка, состоящая из глюкозопептидогликана, у растительной клетки – целлюлозная стенка, у животной – это мембрана.

2. Гомогенизация

Типы:

а) механические

- слабые (измельчение биоматериала)

- средние (перетирание с абразивом, лопастной гомогенизатор)

- Френч-пресс

б) физические

- температура (понижение температуры ниже нуля градусов)

- осмос

в) химические методы

- поверхностно активные вещества (ПАВ) и органические растворители

При выделении мембранных интегральных белков из мембраны необходимы ПАВ и органические растворители.

г) ферментативная

- лизоцим и аналогичные ферменты

- гликолитические комплексы (например, комплекс из виноградной улитки)

Это наиболее мягкое разрушение клеточной стенки.

3. Меры предосторожности

Компартментализация – каждый белок находится в своем месте. При разрушении клетки белки смешиваются с другими компонентами клетки, которые могут повлиять на их активность.

А) Протеазы

- сериновые протеазы

Меры борьбы: добавлять необратимый ингибитор фенилметилсульфонилфторид (PMSF). Также им можно титровать активный центр фермента.

- тиоловые протеазы

Меры борьбы: добавлять необратимый ингибитор, соли металла.

- металлопротеазы

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Меры борьбы: хелатирующие агенты (ЭДТА)

- кислые протеазы

Меры борьбы: нейтральные значения pH

Б) нуклеиновые кислоты (заряжены при разрушении клетки)

Меры борьбы: Нуклеазы (разрезают нуклеиновые кислоты); стрептомицин сульфат

В) полифенолы

OH группы могут окисляться до карбонильных, и может начаться полимеризация до фенолформальдегидных смол.

Меры борьбы: поливинилпирролидон

4. Грубая экстракция

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 3

Методы очистки и выделения белков. (Продолжение)

5. Осаждения.

Первый метод – **изоэлектрическое осаждение.**

Это осаждение за счет электростатического взаимодействия между противоположно-заряженными группами на разных глобулах белка. Чем ниже ионная сила, тем оно эффективнее. Максимальное осаждение достигается при pH среды близком к изоэлектрической точке.

Второй метод – **высаливание.**

Проходит на молекулярном уровне.

Если на поверхности в контакте с водой есть протяженные неполярные области, то вокруг таких областей возникают ледоподобные структуры. В раствор добавляют соль, некоторые молекулы воды начинают гидратировать ионы. Когда все молекулы воды из объёма задействованы в гидратации, ледоподобная структура разрушается, и молекулы воды вступают взаимодействие с ионами. Происходит слипание вследствие гидрофобных взаимодействий.

$$-\Delta G = \Delta H - T\Delta S = \Delta Hp - T\Delta Sp + \Delta Hs - T\Delta Ss$$

Неполярные области, экранированные водой, не взаимодействуют. В среду добавляют низкомолекулярную соль. Происходит возрастание ΔHs по абсолютной величине. Идет гидратация, энтальпия падает. Суммарно всё становится меньше нуля.

Если ввели достаточную концентрацию соли, появилось много ионов в растворителе, в итоге белки слипнутся.

Типовая зависимость выпавших белков выглядит так (рис.3.1):

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

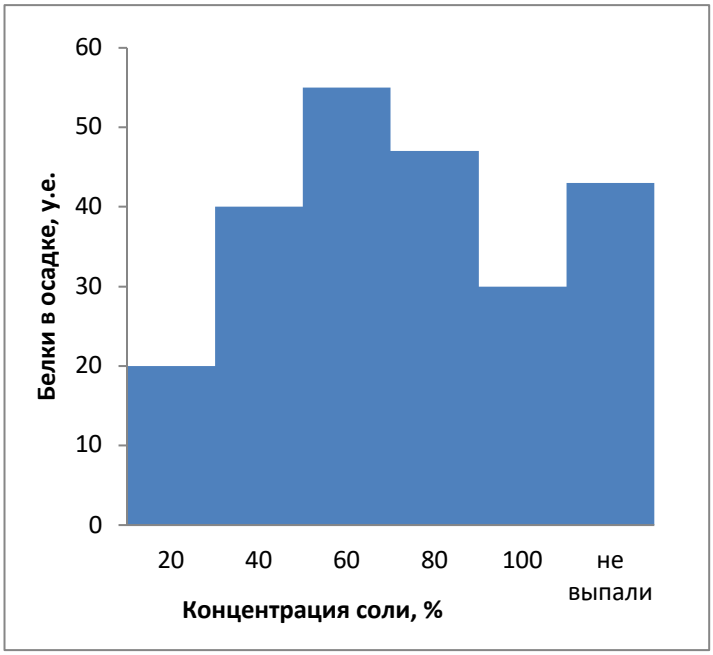


Рис 3.1 Зависимость выпавших белков от концентрации соли

Какие-то белки останутся в растворе. При низкой концентрации выпадают самые гидрофобные белки. Если на поверхности не будет никаких гидрофобных участков, то механизм не сработает. При проведении данного механизма, нужно проверять ферментативную активность.

Если нужен очень чистый фермент, нужно выбрать участок 65-75%. Если нужно сохранить большее, то 45-100%.

Требования к соли

Катионы мало влияют на высаливающую силу. Важны анионы. NaCl не обладает высокой высаливающей силой.

А) Высокая высаливающая сила

Ряд Гофмейстера: $Cl^- < HPO_4^{2-} < SO_4^{2-}$

Чем более многозарядный анион, тем больше его высаливающая сила.

Б) Высокая растворимость. $(NH_4)_2 SO_4$ 4M

В) Высокая плотность

От плотности зависит, пойдет ли на дно белок при центрифугировании или нет. Частицы, которые плотнее окружающего растворителя, идут вниз. Нужно подбирать

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

соль, которая, образуя осадок с белком, будет давать частицы, у которых плотность выше. Плотность частиц с белком, выпавших в осадок, должна быть выше плотности раствора.

Г) Чистота соли

Д) Доступность соли

Парадокс: белки, осажденные сульфатом аммония, обладают высокой стабильностью. Могут долго храниться при пониженной температуре.

Осадок белка под действием сульфата аммония формируется не сразу, необходимо время для формирования (30-60 минут).

Третий метод – **осаждение под действием температуры**

Белок денатурирует в ограниченном интервале температур после нагревания и переходит в осадок – это положительная кооперативность. Обычно при 7-8 градусах.

Активность

1 вариант. Если активность растет и в этом же интервале температур падает, значит, белок выпадает в осадок и инактивируется.

2 вариант. Если целевой белок выпадает и теряет активность, то нужно нагреть до заданной температуры и дать выпасть всему осадку, и оставить белок в растворителе. Если известно, что белок обладает аномальной термостабильностью, в том смысле, что его можно перевести в осадок, а потом перерастворить без риска инактивации, то удобно перевести в осадок.

3 вариант: Фермент не выпадает в осадок и не теряет активности.

Четвертый метод – **осаждение изменением pH**

Не подходит для смеси среднестатистических белков. Само изменение pH не всегда приводит к выпадению осадка.

Пятый метод – **органический растворитель**

Органические растворители – это растворители, смешивающиеся с водой. Большинство – полярные растворители. Влияют на электростатику. Добавляя растворитель в систему, нарушаем систему водородных связей объемной воды. Это сказывается на гидрофобных взаимодействиях. Проходят два механизма: агрегация за счет электростатических взаимодействий или разворачивание белка. Если фермент имеет много разноименно заряженных групп, большая вероятность выпадения в осадок

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

после добавления спирта. Если белок выпадает и остается в нативной конформации, то переводим его в осадок.

Третий, четвертый и пятый методы связаны между собой, так как все они говорят об агрегации за счет электростатических взаимодействий. pH должен быть близок к pI, тогда белок хорошо выпадает в осадок при добавлении спирта.

6. Хроматография

Хроматография – это разделение смеси веществ, основанное на их различном «сродстве» в подвижной и неподвижной фазе.

Параметры классификации:

- «Аппаратное» оформление: *бумажное, тонкослойное (ТСХ), колоночное*
- Природа подвижной фазы: *жидкостная, газовая*
- По давлению: *нормального давления, высокого давления*
- По методу детекции: *(в зависимости от вещества) подходит любой физико-химический метод*

Природа «сродства»: см. дальше.

Для **белков** используют колоночную хроматографию, жидкостную хроматографию, нормальное давление и высокое, метод детекции – следят за белком по D280 и за специфической активностью.

Основные компоненты хроматографической системы

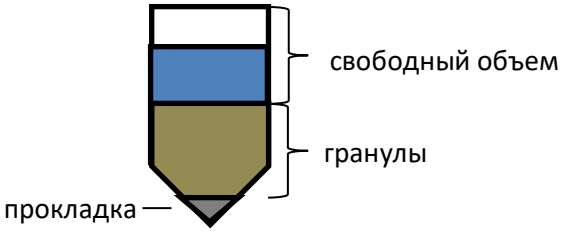


Рис 3.2 Основные компоненты хроматографической системы

Успех разделения смеси зависит от однородности носителя. Если носители набухают, их нужно заранее замачивать. Гранулы помещаются в колонку, и через колонку прогоняется десять свободных объемов. Свободной объем – это весь объем колонки без учета гранул. Необходимо следить, чтобы внизу колонки был зажим.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

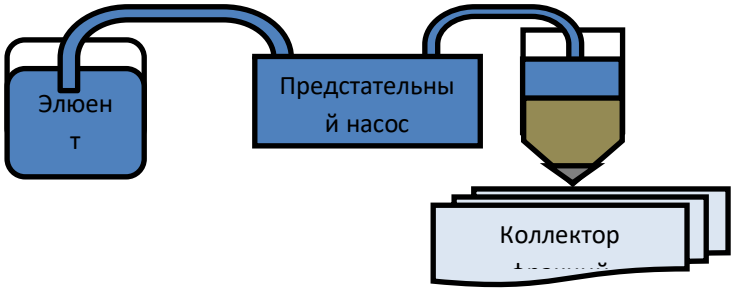


Рис 3.3 Схема прибора для хроматографии

Растворителем называется элюент, а процесс прохода вещества через колонку называется элюированием. Внизу колонки находится коллектор фракций – чаще всего это штатив с пробирками. После сбора фракций проверяют на D280 и специфическую активность. Важно знать длину колонки и скорость пропускания.

Диффузия конкурирует с различным сродством веществ в подвижной и неподвижной фазе. Если колонка длинная, то пики уширятся, если узкая, то пики будут перекрываться. Слишком высокая скорость – пики не разойдутся, слишком низкая – уширятся.

Природа сродства

Обычно при очистке белков используют пять типов хроматографии.

Таблица 3.1 Типы хроматографии

№	Название	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Природа сродства	Применение
1	Гель-фильтрация	Пористые гранулы	Жидкость	Диффузия	Обессоливание, разделение белков (препаративное), определение молекулярной массы белка (аналитическое)
2	Адсорбционная хроматография	Твердая	Жидкость	Сила адсорбции	Стадия очистки (препаративное)
3	Распределительное	Жидкость	Жидкость	Коэффициент распределения	Стадия очистки (препаративное)
4	Ионно-обменная	Твердая	Жидкость	Электростатика	-
5	Аффинная	Твердая	Жидкость	Биологическое сродство	-

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Препаративный метод – это метод, в котором проходит выделение максимального количества белка для его дальнейшего использования. Применяются для очистки от примесей.

Аналитический метод – это метод, в котором количество белка неважно, а важно его детектирование.

Чтобы определить молекулярную массу, надо построить калибровочную зависимость LgMM от объема на выходе или времени пропускания. Далее строят линейную зависимость и по ней определяют молекулярную массу неизвестного белка. Для построения калибровочной зависимости используют белки-маркёры. Если белки будут иметь разную форму, зависимость будет нелинейной. Чтобы исправить это, следует денатурировать белки (целевой в том числе), тогда всё будет зависеть только от молекулярной массы.

При распределительном типе хроматографии жидкости не смешиваются друг с другом. Есть два варианта в прямых и обращенных фазах. Если взять силикагель или полисахаридный носитель, они хорошо сорбируют на себя воду, затем в колонку в качестве элюента вносится неполярный растворитель.

Ионно-обменная хроматография: носитель обогащен заряженными группами. Носители называются ионообменниками. Делятся на катионообменники и анионообменники. Те и другие делятся на слабые и сильные. **Катионообменники** заряжены отрицательно. Слабые содержат карбоксильную группу (например, карбоксиметилцеллюлоза). Сильные – сульфогруппу. **Анионообменники** заряжены положительно. Например, DEAE (диэтиламиноэтил).

Разницей между сильными и слабыми ионообменниками является диапазон значений pH, в котором они заряжены.

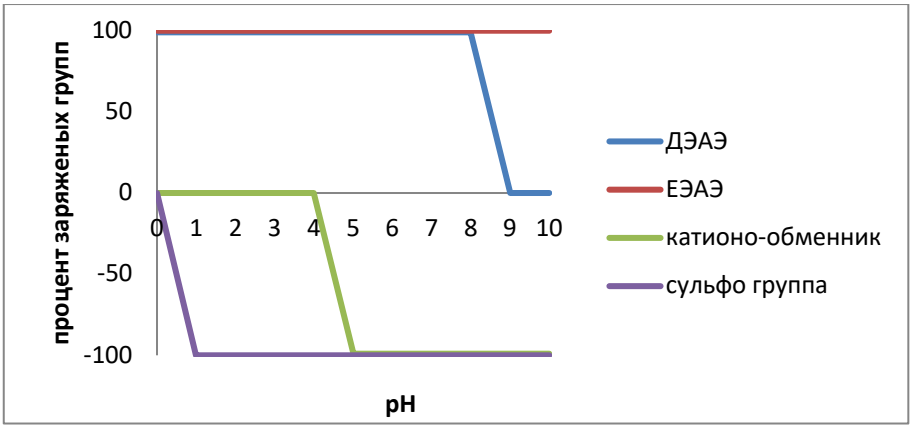


Рис 3.4 Зависимость процента заряженных групп от pH

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

На схеме в верхней половине располагаются положительно заряженные анионообменники и на нижней - отрицательно заряженные катионообменники. Можно видеть, что сильные катионо- и анионообменники заряжены на большем промежутке значений pH, чем слабые. Важно помнить значения pK: для аминогруппы в районе 9 и для карбоксильной группы в районе 5.

Слабые катионо- и анионообменники используются чаще, так как проще подобрать значение pH так, чтобы зарядов не было много, тогда белок не будет денатурирован.

Лекция 4

Методы очистки и выделения белков. Круговорот веществ в природе

Ионообменная хроматография

Помним колонку, в которую вносим какой-то белок. Нужно разобраться, при каком pH делать внесение. Белки должны различаться, чтобы их нужно было делить на ионно-обменной хроматографии. Белки, у которых совпадает изоэлектрическая точка, не подходят для хроматографии.

Белок	pI
A	5
B	7
C	9

Катионообменник. Имеет отрицательно заряженные группы.

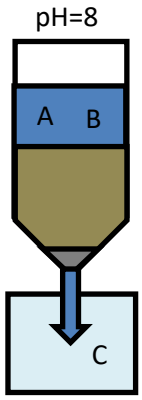


Рис 4.1 Схема разделения на колонке

Варьируя pH, можно добиться того, что все белки не свяжутся и пройдут вниз. Это называется проскок. Лучше подбирать так, чтобы в проскок что-то попало, но многое осталось в колонке. Зная pI целевого белка, можем либо оставить его в колонке, либо отправить в проскок. При pH ниже pI белок заряжен положительно и будет связываться. При pH = 8 A и B заряжены положительно и свяжутся, а C окажется в проскоке. Одно из применений ионно-обменной хроматографии – концентрирование белков. Если белок разбавлен, можно внести в маленькую колонку, после элюирования может оказаться успешно.

Если надо выделить B и дальше работать, то снятие белков можно проводить при помощи pH, но если белков много это неудобно, и лучше менять ионную силу. Чем больше низкомолекулярного электролита в системе, тем слабее связи между гранулами

и белком. Чем больше разница между pH среды и pI белка, тем тяжелее его отделить. **Изократическое** элюирование – постоянная ионная сила.

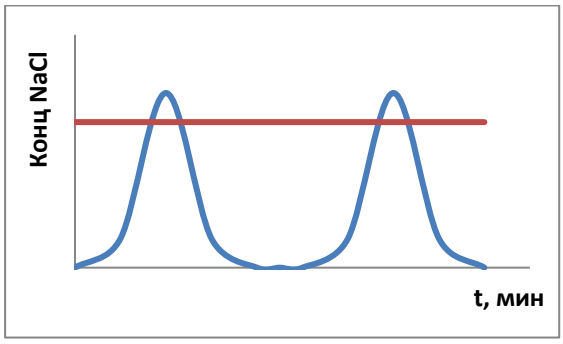


Рис 4.2 Пример графика изократического элюирования

Можно вести процесс при постоянной концентрации NaCl. **Градиентное** элюирование используется чаще.

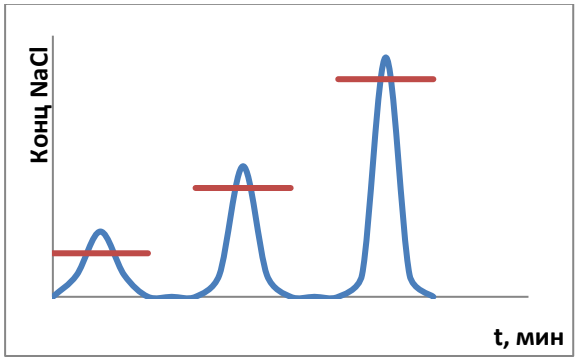


Рис 4.3 Пример графика градиентного элюирования

Основная проблема – всего несколько ступенек. Чаще всего пользуются **линейным градиентом**.

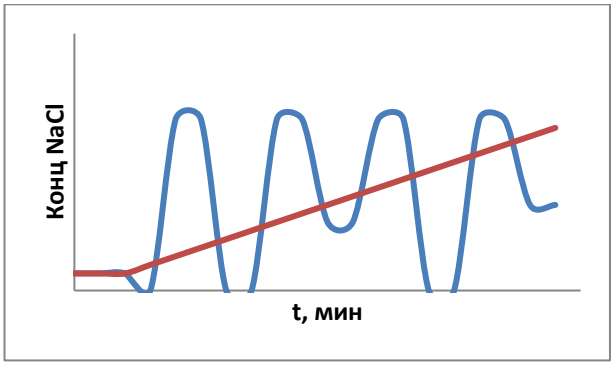


Рис 4.4 Пример графика линейного градиентного элюирования

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Посадка белка ведётся при концентрации NaCl 0.1M. Чтобы добиться градиента, в один из смешивающихся сосудов наливают 0.1M NaCl, в другой – 1M. Первым делом выливается 0.1M раствор, уровень жидкости падает, тут же добавляют 1M, они смешиваются. Варьируя скорость подачи и концентрации, можно добиться оптимального наклона прямой. Метод также используется как препаративная стадия очистки.

Аффинная хроматография хороша высокой селективностью, специфичностью, высокой константой связывания – от 10^6 до 10^9 (может быть и 10^{12}). За 1 стадию удается добиться в тысячи и десятки тысяч раз более глубокой степени очистки. Минус – нужно самостоятельно готовить носитель, модифицированный какой-либо группой. При хорошей константе связывания нужно добиться того, чтобы похожие белки не связывались. Также возможны вариант привнесенной аффинности.

Электрофоретические методы

1. Электрофорез

В ванночке находятся вода и фермент. С одной стороны, плюс (анод), а с другой – минус (катод). Под действием электрического поля фермент будет двигаться к плюсу или к минусу в зависимости от соотношения pI и pH. Если pH выше pI, то фермент двинется к плюс и наоборот. А если pH = pI, то фермент останется на месте. Теоретически можно применять при разных белках, но практически сделать это очень сложно и мешает диффузия. Если вместо ванночки использовать *фильтровальную бумагу*, ситуация улучшается. С одной стороны, диффузия ограничится, с другой начнется неспецифическая сорбция.

Полиакриламидный гель (ПААГ, PAG E). Обычно его делают таким образом: используют некий «монолит» со стартовыми позициями и дорожками. С одной стороны - плюс, с другой стороны минус. Какой-то белок наносится на дорожки, и система замыкается. В результате, если pH ниже pI белка, то белок двинется к минусу. Подбирают систему так, чтобы все белки двигались в одном направлении. Необходимо, чтобы фрагмент геля был не слишком толстый, так как нужно заботиться об отведении тепла. Гель инертен и не должен мешать. Результат зависит от:

а) масса, (чем меньше, тем лучше)

б) форма (чем более сферическая, тем лучше),

в) плотность заряда (чем выше, тем лучше),

г) размер «ячеек» геля.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Дальше процесс останавливаем, и можно экстрагировать белок из фрагмента геля. Если разомкнуть систему, подвижность не сильно пострадает.

Есть 2 способа сделать гель: использовать готовые полимерные цепочки (пример – крахмал) или использовать мономеры (например, акриламид) при помощи N-функционального сшивающего агента. Далее варьировать концентрации и соотношения мономера и сшивки и получать регулярный гель с разным размером внутренних ячеек. Гель должен быть инертен по отношению к белкам. Полиакриламид можно использовать в лекарствах, если доказать, что в нем нет акриламида.

Применения электрофореза:

А) Препаративная стадия (нечасто)

Б) Степень гомогенности

В) Определение молекулярной массы (денатурирование)

Иногда делают нативный форез для определения молекулярной массы. Для определения степени гомогенности и зачастую для молекулярной массы делают электрофорез в денатурирующих условиях, т.к. белки различаются формой, а калибровку желательно делать от массы, чтобы уменьшить искажение результатов. Чаще всего берут денатурат – одновременно ПАВ. Чаще всего это ДСН (SDS) – одновременно и денатурат, и детергент (ПАВ). В результате белки переходят в эллипсоидную денатурированную конформацию. На поверхность выходит часть внутренних аминокислотных остатков. Затем ДСН закрывает хвостами эти области и придает отрицательный заряд. Кусок геля не должен быть слишком толстым (нужно заботиться об отведении тепла).

1. Изоэлектрофокусирование

Также используется фрагмент геля с дорожками в нём и плюсом и минусом на противоположных сторонах. Внутрь заносится фермент. Будет фермент двигаться или останется в месте внесения зависит от pH. Если гель просто плавает в воде, то pH неконтролируем, а задача изоэлектрофокусирования – создание в оптимуме градиента pH. Помимо фермента добавляются *амфолины* – относительно низкомолекулярные вещества (олигопептиды), различающиеся количеством карбоксильной и аминогруппы и значением изоточки pI, они являются буферами при pH равном pI. После замыкания системы амфолины двигаются таким образом, что остановятся каждый при своем pI, т.к. в нем они электронейтральны. Остановившись, начинают проявлять буферные свойства, и получается градиент pH. Амфолины намного меньше чем белок. Затем белок движется по градиенту, и pH изменяется в сторону pI. Белок обладает инерцией.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Дойдя до значения 0, сохраняет подвижность, и происходит «перезарядка». В итоге получается узкая полоса и фокусировка.

Применение: редко препаративно, используется для определения степени гомогенности и pI фермента. Знать pI нужно, чтобы целенаправленно вести очистку в первую очередь для ионно-обменной хроматографии.

Основы биохимии

Все организмы участвуют в большом круговороте (углерода и азота).

Круговорот углерода в биосфере

Организмы делятся на автотрофов и гетеротрофов. Автотрофы способны к фотосинтезу. Из CO_2 и H_2O способны производить органические молекулы. Гетеротрофы не способны к фотосинтезу, они должны получать углерод, поедая автотрофов. Побочный процесс – образование *кислорода.* Движущая сила – солнечный свет. К гетеротрофам относятся животные, к автотрофам – растения, бактерии, цианобактерии. Бывают организмы автотрофные и гетеротрофные одновременно.

Организмы делятся на *аэробов* и *анаэробов*. Аэробы обитают в кислородной среде. Анаэробы могут жить в бескислородной среде. У людей тоже могут быть анаэробные процессы. Анаэробы бывают *факультативные* и *облигатные*. Для *облигатных* кислород является ядом (некоторые глубоководные организмы), для *факультативных* – отсутствие или наличие кислорода непринципиально.

Круговорот азота в природе

Азот – инертная молекула. Содержание в атмосфере – 78%. Только азотофиксирующие бактерии способны фиксировать азот в атмосфере. Они имеют нитрогеназы. Это комплексы ферментов (мультиферменты), осуществляющие процесс фиксации. Превращают азот в *аммиак*. Его поедают нитрифицирующие бактерии. В результате получаются *нитраты*. Они употребляются растениями, и они выделяют *аминокислоты*, которые употребляются животными, выделяющими, в конечном счете, *аммиак*. Помимо азотфиксирующих бактерий цианобактерии также могут фиксировать азот.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 5

Метаболизм

Метаболизм – совокупность процессов, происходящих в организме. Метаболизм может быть первичным и вторичным. Основное внимание планируется уделять первичным процессам. Первичные процессы – «крупнотоннажны» и критичны для организма, малейшая блокировка приводит к летальному исходу. Эти процессы идут в практически неизменном виде во всех организмах на земле.

Абсолютное большинство реакций метаболических катализируются ферментами. В подавляющем большинстве случаев это не отдельные реакции, а цепочки. Зачастую очень трудно увидеть окончание цепи, так как все процессы связаны друг с другом.

Типы процессов:

линейные

$$\begin{array}{ccc} A & & \\ \downarrow & & E1 \\ B & & \\ \downarrow & & E2 \\ C & & \\ \downarrow & & E(N) \\ N & & \end{array}$$

циклические

$$A \xrightarrow{E1} B \xrightarrow{E2} C \xrightarrow{E3} \ldots \xrightarrow{E_N} N \xrightarrow{E_{N+1}} A$$

Зачастую эти процессы сопряжены. Каким бы ни был процесс, он подвергается очень тонкой регуляции. Это особенность всех процессов, протекающих в живой материи. Организмы построены очень экономно, энергия не расходуется впустую.

Регуляция реализуется на трех уровнях:

- **обратная связь** (непосредственный продукт ферментативной реакции или продукт последующих реакций выступает ингибитором фермента, который катализирует данную реакцию). Пример: как только в системе перестает расходоваться N, начинает накапливаться промежуточный продукт. Как только возрастает концентрация B (см. схемы выше), он начинает ингибировать продукт E1, и процесс производства B прекращается. Это может быть непосредственный продукт этой стадии

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

(B), а может быть C или N. Чаще блоком выступает непосредственный продукт или продукт следующей стадии.

Для этого у ферментов есть центры связывания.

Ингибирование – распространенное явление в живой природе.

- **гормональный**. Гормоны оказывают огромное влияние на интенсивность процессов.

- **на уровне биосинтеза фермента**. Когда возрастает концентрация вещества, которое необходимо срочно перерабатывать, зачастую реализуется механизм срочной наработки фермента, который будет превращать это вещество. Иногда **2** и **3 методы** выступают в комбинации, но в цепочках также может существовать и обратная связь.

Катаболизм – процесс метаболического распада сложных веществ на более простые или окисления какого-либо вещества, т.н. деградация исходного вещества.

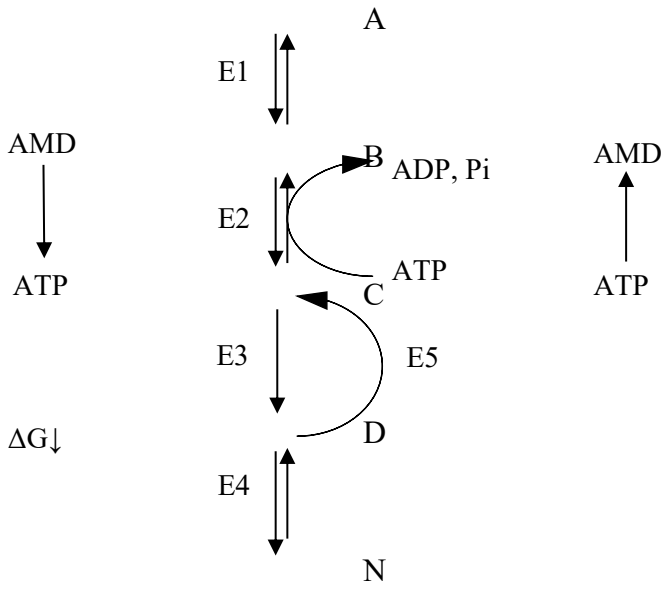


Рис 5.1 Общая схема катаболизма

Этот процесс идет со снижением энергии, как и в целом, все процессы в организме. Ферменты в равной мере ускоряют прямую и обратную реакцию, но не влияют на положения равновесия. Существует и обратный процесс, когда из N синтезируется A. Затраты энергии однозначно существуют в любом из данных вариантов. Когда все стадии обратимо катализируются одними и теми же ферментами, невозможно ускорить катаболический путь, или затормозить анаболический. Или оба ускоряются, или оба замедляются, а это нерационально.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

В данном процессе может быть сколько угодно одинаковых стадий, но как минимум одна должна идти по другому пути и катализироваться другим ферментом. Возможна реализация ситуации, когда катаболический процесс ускоряется благодаря АМФ и блокируется из-за АТФ (ATP) высокой концентрации. Так же возможна ситуация, когда ферменты будут разными, но регуляция будет взаимосогласованной (реципрокной).

Равновесие может быть смещено в другую сторону, одна из стадий обязательно будет необратимой и на ней будет падение энергии $_{\Delta}G$. Такие стадии в анаболическом пути идут по-другому.

Основная энергетическая валюта в клетке – АТФ.

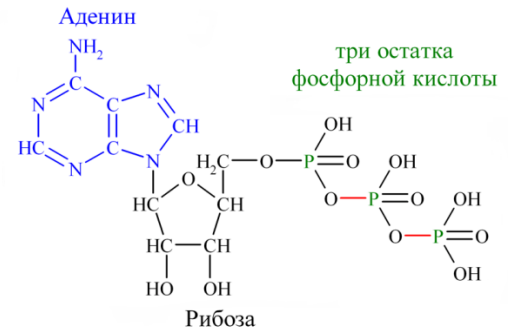


Рис 5.2 Формула АТФ

АТФ несет суммарный заряд 4-. Как и многие другие фосфорилированные соединения, АТФ существует в комплексе с Mg, и ферменты проявляют специфичность к комплексу с Mg. Препараты типа «Кардиомагнил» помогают действию сердечной мышцы. Они поставляют Mg, чтобы гликолиз протекал активнее.

АТФ имеет две макроэргических связи между 3-2 и 2-1 фосфатными группами.

$$\Delta G = -7{,}3\frac{\text{ккал}}{\text{моль}}.$$

Гидролиз АТФ

$$АТФ^{4-} + H_20 \leftrightarrows АДФ^{3-} + Pi^{2-} + H^{+}$$

ΔG стандартная биохимическая – это стандартные условия и одномолярные исходные концентрации при pH = 7,0.

Такой энергией (-7,3 ккал/моль) обладают обе группы – АТФ до АДФ и фосфата, АДФ до АМФ и фосфата. АМФ до фосфата и аденозина – ΔG = -3,5 ккал/моль. Если в

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

энергетических целях начинает использоваться АМФ – это ведёт к летальному исходу. Энергия макроэргической связи – высокоэнергетическая.

Pi – это превалирующая форма ортофосфорной кислоты, которая существует при pH около 7.

Есть некое количество молекул, в которых столько же энергии сколько и в АТФ (ATP): ГТФ (GTP), ЦТФ(CTP), УТФ(UTP). У каждого из азотистых оснований есть своя специализация:

A – энергия. G – регуляция ферментов, C –превращение липидов, U – превращение углеводов. Если в каком-то процессе образуется одна из молекул, энергия в таком виде не хранится. Пример: ГТФ + АДФ ⇆ ГДФ + АТФ. Концентрация АТФ в организме на пару порядков превышает количество всех остальных нуклеотидов. Причины большого количества энергии в АТФ:

1 причина: концентрация протонов на много порядков ниже чем концентрация всех остальных участников.

2 причина: если заряды рассматривать как точечные, то они электростатически расталкиваются, что препятствует протеканию обратному процессу.

3 причина: в результате гидролиза АТФ образуется АДФ и фосфат, которые обладают набором резонансных структур, что дополнительно их стабилизирует и снижает уровень свободной энергии.

Совокупность этих причин убеждает в том, что неслучайно именно АТФ обладает энергией.

Пример высокоэнергетических соединений

NAD(P)H. NAD и NAT участвуют в ферментативных реакциях, но не связаны прочно с конкретной глобулой. Являются коферментами дегидрогеназ. Катализируют ОВР, в которой AH_2 отдает H_2, NAD^+ восстанавливается до NADH и получается дегидрированный органический субстрат A. Реакция обычно обратима.

NADH восстанавливается, покидает конкретную глобулу, и в найденном сопряженном процессе генерируется NAD^+.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

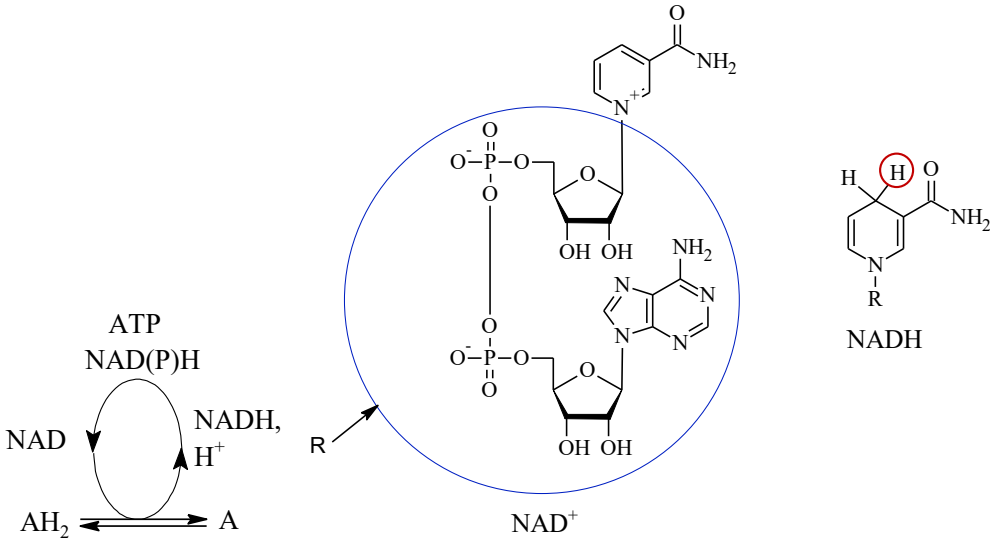


Рис 5.3 NAD^+ и NADH

NAD^+ это окисленная форма, готовая восстановиться. В результате восстановления никотинамид переходит в восстановленную форму.

Плюс с азота исчезает и появляется 1 новый водород. Водород переносится с органического субстрата на NAD^+ в форме гидрид аниона. То есть переносятся 1 протон и 2 электрона. Двухэлектронный окислительно – восстановительный процесс. NAD(P) бывает, когда образуется фосфатная группа. NAD(P)H специализируется по анаболическим процессам, а NAD по катаболическим.

Можно использовать энергию напрямую при восстановлении чего-либо восстановленной формой NAD или NAD(P). Молекула NADH может расходоваться при производстве АТФ. Из одной молекулы NADH получается 2,5 молекулы АТФ (по новым данным). В организме больше окисленной формы NAD, а NADP – восстановленной. NADPH – источник энергии необходимый, чтобы синтезировать нужные молекулы. Возможна прямая передача энергии, или же превращение энергии, запасание в АТФ.

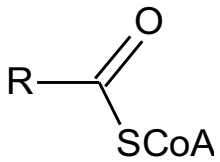


Рис 5.4 Общая формула ацила

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

В организме много жирных кислот, они превращаются в сложные тиоэфиры с коферментом А. Энергия тиоэфиров превосходит АТФ.

оферментj (CoA-SH)

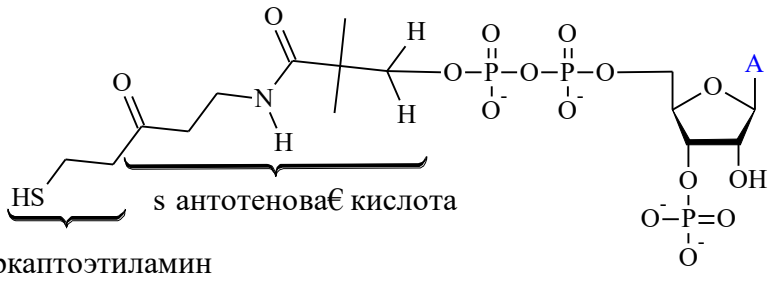
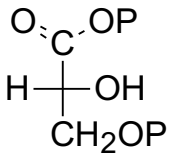


Рис 5.5 Кофермент А

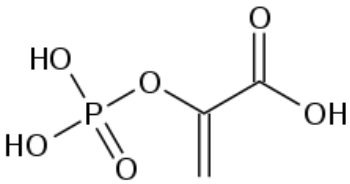
Кофермент А состоит из 3-х блоков: первый – немного модифицированный АДФ, второй – остаток витамина В5 и наконечник в виде остатка β-меркаптоэтиламина. SH группа атакует карбонильный атом углерода, и образуется сложный тиоэфир. В процессе гликолиза образуется 2 промежуточных продукта, богатых энергией: 2 фосфоглицероилфосфат PGP (смешанный ангидрид ортофосфорной кислоты и фосфоглицериновая кислота) и фосфоенолпируват (PEPvt).



ΔG гидролиза = -11, 5.

Рис 5.6 Фосфоглицероилфосфат

Второе соединение фосфоенолпируват (PEPvt)



ΔG = -14,5

Рис 5.7 Фосфоенолпируват

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Ацилкоферменты А не используются как прямой источник энергии или предшественник АТФ. Они нужны для переноса ацила от одного фермента к другому. Чтобы из жирной кислоты и АТФ получить ацилкофермент А, нужно потратить две макроэргические связи.

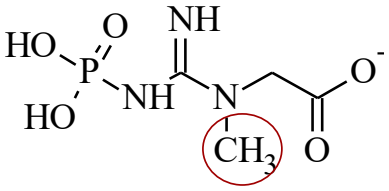


Рис 5.8 Строение креатинфосфата

Если прометилировать гуанидиновую группировку гуанидинацетата, то получится креатинфосфат. Это депо энергии в мышцах. Как только в клетке падает концентрация АТФ, то в качестве источника для пополнения АТФ используется креатинфосфат. Фосфатная группа передается с креатина на АДФ.

Энергетический заряд клетки $Z = \frac{[АТФ]+1/2[АДФ]}{[АТФ]+[АДФ]+[АМФ]}$. Организм в норме, когда Z = 0,9 – 0,95.

Катаболизм - это процесс метаболического распада, диссимиляция от сложных молекул к простым, анаболизм – наоборот. Эти процессы разнонаправлены и взаимосвязаны. Катаболизм поставляет в анаболизм строительные блоки (аминокислоты, моносахариды, глицерин) и энергию (АТФ, NADH).

АДФ превращается в АТФ, и энергия тратится на анаболизм, движение, обогрев, активный транспорт. Активный транспорт – транспорт против градиента концентрации.

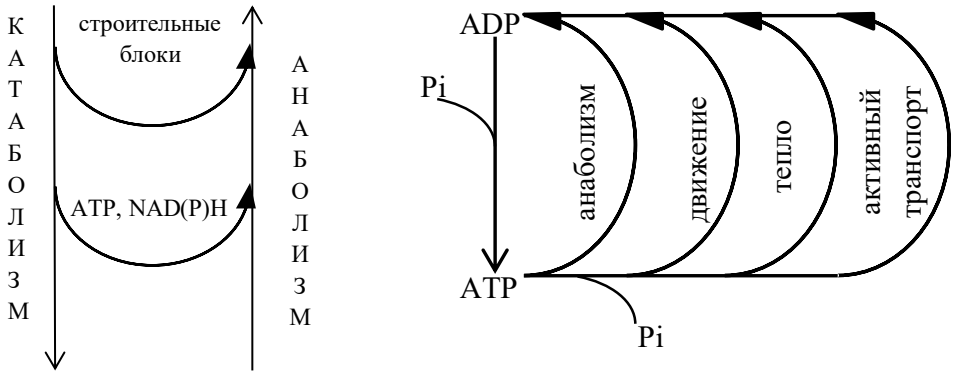


Рис 5.9 Схема катаболизма-анаболизма и перехода ADP- ATP

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 6

Биохимическое дыхание

Катаболизм углеводов – один из центральных путей, так как на долю углеводов приходится порядка 30%. При этом порядка 60% приходится на жирные кислоты. В организме энергия хранится в виде триацилглицеридов. *Глицерин* выступает носителем в хранилище, а жирные кислоты – топливо. 10% приходится на долю аминокислот. Самый быстромобилизуемый запас – это углеводы, используются первыми, на них бегут короткие и средние дистанции, после включаются жирные кислоты. Белки становятся источником энергии, когда истощается другое топливо.

$$C_6H_{12}O_6 + O_2 = CO_2 + H_2O$$

Этот процесс сгорания не всегда протекает просто и не всегда до конца. Если он идет до конца, он называется биохимическим дыханием. Он состоит из трёх основных стадий.

$C_6H_{12}O_6$ за десять стадий режется до пирувата. После первого этапа остается очень много энергии. За этим этапом (гликолизом – лизисом сахара) реализуется превращение ацетилкофермент А и вылетает CO_2, и в виде уксусной кислоты топливо попадает в циклический процесс, который называется циклом Кребса. Оттуда вылетает оставшаяся молекула CO_2 (энергии еще нет), происходит унификация: энергия собирается в стандартном виде, в основном в виде NADH. Также образуется $FADH_2$. Из одной молекулы глюкозы получается две молекулы пирувата. На этом этапе все 6 атомов углерода улетели в виде CO_2. Энергия находится в промежуточной, но стандартной форме. На третьем этапе включается электрон-транспортная цепь, и электрон начинает переноситься.

Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) – это набор окислительно-восстановительных реакций между пространственно-сближенными молекулами. Перенос электрона происходит с падением энергии. В конечном счёте электрон переносится на атом кислорода. Здесь же плавают протоны, и в результате образуется молекула воды. Если повреждены мембраны и митохондрии, энергия не вырабатывается и строительные блоки не образуются. В нормальной ситуации с ЭТЦ сопряжен процесс окислительного фосфорилирования. Создается АТФ.

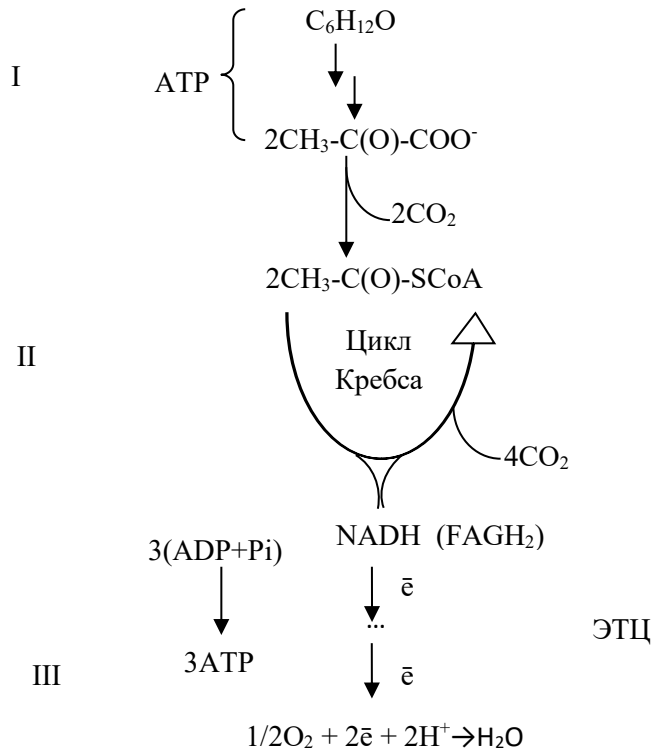


Рис 6.1 Схема биохимического дыхания

- 1 этап: предподготовка – гликолиз
- 2 этап: унификация энергии
- 3 этап: извлечение энергии

1. Глюкоза в циклической фермента первой стадии фосфорилирование за счет АТФ.

Фосфорилируется глюкоза по шестому положению (это положение самое свободное и доступное), туда попадает фосфатная группа.

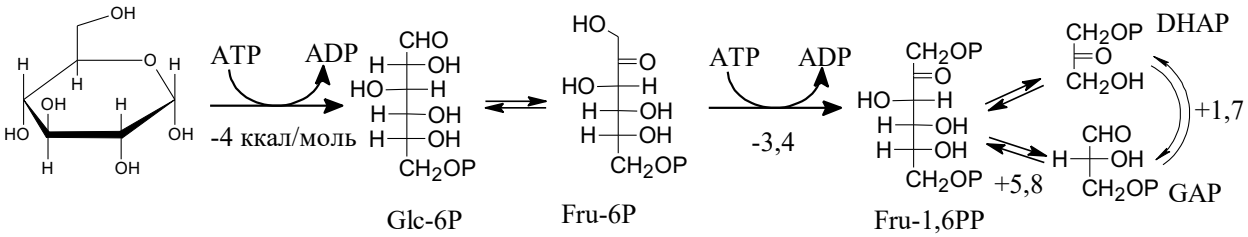


Рис 6.2 (1) этап гликолиза

Сначала энергия вкладывается, а затем получается. Исходная реакция является первой запусковой, на которой энергия тратится. Эта реакция протекает с сильным падением свободной энергии. ΔG биохимическая составляет -4 ккал/моль. В глюкоза-6-

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

в фосфате мало энергии. Регуляторным ферментом является *гексокиназа*. Ингибирование гексокиназы продуктом реакции происходит в случае, когда потребность в пирувате падает. Фермент специфичен к разным гексозам.

Затем идёт обратимая изомеризация, глюкоза фосфат превращается в фруктоза фосфат ГЛЦ, ГЛЦ6Ф, ФРУ6Ф. Реакция обратимая, катализируется глюкозофосфатизомеразой (фосфоглюкоизомеразой). ΔG = 0,4.

Вторая запусковая реакция – трата еще одной молекулы АТФ. Получается почти симметричная молекула фруктозо-1,6-дифосфат, которая обозначается ФРУ16ФФ. Реакция необратима. ΔG = -3,4. Фермент для этой реакции – фосфофруктокиназа. *Киназы* – это ферменты, которые катализируют реакции фосфорилирования за счет АТФ (или другого высокоэнергетического соединения). Далее происходит некая активация. Суть реакций – активировать молекулу глюкозы. Эта ретроальдольная реакция, она обратима, её ΔG = +5,8. Получается два триуглеродных фрагмента – CH_2OP и $COCH_2OH$ сверху, а снизу CHOOH и CH_2OP. Фермент, катализирующий эту реакцию – *альдолаза*. Продуктами являются простейшая кетоза и фосфорилированная простейшая альдоза. В гликолизе может использоваться только альдоза, но организм не может терять половину впустую, возможная изомеризация в сторону альдозы идет с ΔG = +1,7 и катализируется триозофосфатизомераза. Фосфатная группа остается на месте, идет альдегидно-кетоновая изомеризация.

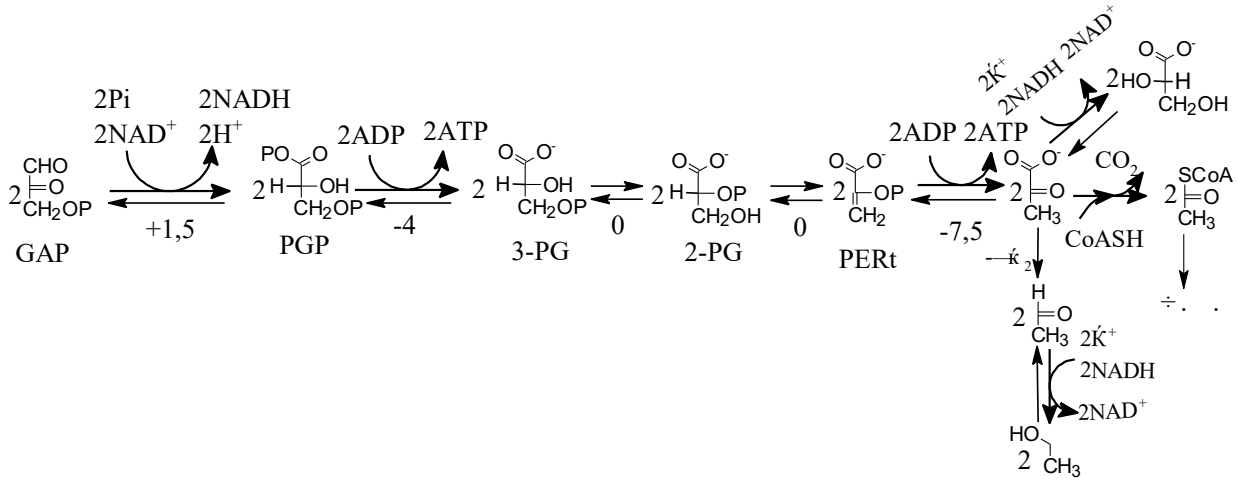


Рис 6.2 (2) этап гликолиза

Дальше две молекулы глицеринового альдегида подвергаются окислительно-восстановительным реакциям, карбонильная группа окисляется до карбоксильной, NAD^+ до NADH и протона, и затем входит неорганический фосфат. В качестве продукта образуется дегидрогеназа. Реакция обратима. Получается два эквивалента смешанного ангидрида, который называется фосфоглицероилфосфат PGP. Он

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

относится к *сверхвысокоэнергетическим*. Фермент, катализирующий реакцию, называется глицеральдегидфосфатдегидрогеназа и ΔG примерно равно 1,5. На этом этапе впервые получается выигрыш в энергии. Гидролиз приводит к тому, что из двух молекул АДФ получается две молекулы АТФ, а в качестве органического продукта остаётся кислота – 3-фосфоглицерат(3-PG). Реакция обратима. Падение порядка - 4 ккал/моль. Фермент называется киназа. Затем идет перенос фосфатной группы из третьего положения во второе, из 3-фосфоглицерата получается 2-фосфоглицерат. У этой реакции ΔG примерно 0. Реакция изомеразная (альдозо-кетозная изомеризация).

Реакции, в которых есть перенос группы внутри субстрата, называются *мутазными* – частный случай реакции изомеризации.

Далее идет обратимая стадия дегидратации, ΔG примерно 0. В результате происходит потеря молекулы воды, получается еще одно сверхвысокоэнергетическое соединение – фосфоенолпируват (PERt). Фермент – енолаза (класс дегидратаз). Не следует путать дегидрогеназу и дегидратазу, так же нельзя путать реакции дегидрирования и дегидратации!

Гидрирование – восстановление. Завершается цепь ещё одной реакцией, в результате которой получается энергия: фосфатная группа с фосфоенолпирувата переносится на АДФ, и получается АТФ, остается пируват. Фермент, катализирующий реакцию, называется *пируваткиназа*. Снижение ΔG = -7,5. Весь процесс гликолиза необратим.

Исходное и конечное соединение не фосфорилированные. Все промежуточные – фосфорилированные. В большинстве случаев, фосфатные группы живут в комплексе с ионами магния. На этапе «инвестиций» тратится две молекулы АТФ, на этапе «получения дивидендов» они возвращаются за счет глицероилфосфата. Энергетический результат гликолиза – +2 молекулы АТФ. Молекулы АТФ – самая быстрая форма энергии.

Глюконеогенез

Процесс обратный гликолизу – ***глюконеогенез***, то есть производство новой глюкозы.

Проходя по пути полного окисления до CO_2 и H_2O, нужно попадать в цикл трикарбоновых кислот, это самый главный путь для аэробных организмов. Если кислорода хватает, реакция пойдет по пути потери CO_2, превращения в ацетил кофермент А и дальше в цикл Кребса. Этот путь главный, но не единственный.

Если не хватает кислорода, получается L-молочная кислота. Карбонильная группа восстанавливается до карбоксильной. В ситуации, когда постоянно нужна

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

энергия, но кислорода уже не хватает, или он не доносится до мышц, может возникнуть кислородное голодание. Нужно перерабатывать следующие молекулы глюкоза. В результате одного превращения до пирувата два NAD+ переходят в NADH. Неизбежно возникает ситуация, когда NAD^+ закончится. Поэтому протекает реакция восстановления, а рядом реакция окисления NADH до NAD+. Суть этой стадии – расклинить цикл. Гликолиз, проходящий этот путь – анаэробный гликолиз, так же возможен у кисломолочных бактерий. В таком случае он называется *кисломолочным брожением*. Ферментом выступает лактат-дегидрогеназ - LDH. Дегидрогеназа - DH. Другой тип брожения похож на кислородный путь, но сначала улетает CO_2 без окислительно-восстановительных реакций. Остается ацетальдегид.

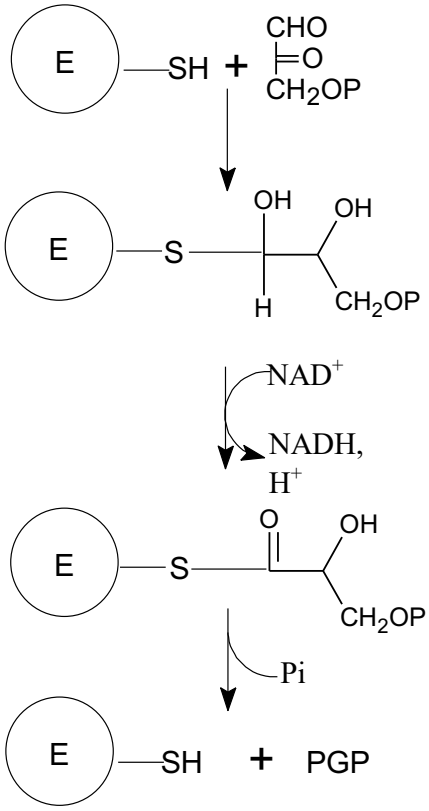


Рис 6.3 Схема работы фермента лактат-дегидрогеназы

Любой путь от пирувата должен приводить к регенерации NAD^+. Она происходит на следующем этапе. Остается этанол.

Первый фермент пути – пируватдекарбоксилаза. Второй – алкогольдегидрогеназа. Этот путь является методом для получения алкоголя.

ГАФТ является тетрамерным белком, содержащим четыре активных центра – на каждой субъединице есть активный центр. В активном центре данного фермента есть

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

СН. На первом этапе приходит глицеральдегид. СН группа – сильный нуклеофил. Происходит атака на карбонильный углерод, и получается тиополуацеталь. Здесь приходит NAD^+. В результате окисления-восстановления тиополуацеталь превращается в тио сложный эфир.

В результате окисления восстановился NAD^+ Далее приходит неорганический фосфат и снимает этот фрагмент с фермента, и теперь он атакует карбонильный углерод. В результате образуется регенерированный фермент и уходит фосфоглицероилфосфат. Далее образуется смешанный ангидрид.

Любая блокировка пути дыхания, особенно с линейными процессами, грозит летальным исходом. Йодацетат является необратимым ингибитором ГАФТА **ICH2-COO**$^-$. За счет модификации СН группы возникает ковалентный продукт, и ГАФТ перестает работать.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 7

Липиды и мембраны

Липиды по химическому строению – разнородный класс соединений.

Белки – это последовательность аминокислотных остатков, соединённых пептидной связью. ***Нуклеиновые связи*** – это последовательность нуклеотидов. Углеводы близки к CNH_2ON.

Липиды общей формулой не обладают. Этот класс выделяют *по свойствам*. Либо это полностью неполярные молекулы, либо молекулы, содержащие полярную и неполярную часть, то есть вещества *бифильной* или *амфифильной* природы.

Классификация липидов:

1. Простые липиды. Липиды, построенные из трёх атомов – углерода, водорода, кислорода.

А) Воск. Это сложный эфир длинноцепочечного спирта и длинноцепочечной карбоновой кислоты. R – C’’ – O – R’. Многие плоды защищаются слоем воска (например, яблоки).

Б) Триацилглицериды (жиры и масла)

2. Сложные липиды.

А) Фосфоглицериды

Б) Сфинголипиды

В) Липопротеины (ЛП). Состоят из белковой и липидной части. Нет ковалентной связи. Комплекс образуется за счет гидрофобных взаимодействий между неполярными боковыми заместителями соответствующих остатков аминокислот и остатков жирных кислот. Бывают разной плотности (от низкой до высокой плотности, также бывают хиломикроны). Плотность обусловлена составом. Чем больше липидов – тем ниже плотность. Липопротеины высокой плотности так же называются *плохим холестерином.*

1. Стероиды

2. Витамины (водорастворимые типа A, D, E, K), гормоны, изопреноиды и т.д.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Триацилглицериды состоят из трёх разноплановых компонентов: глицерин, остатки жирных кислот и ацил.

Глицерин относится к прохиральному типу соединений.

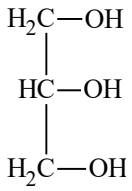


Рис 7.1 Стереохимический нормализованный глицерин

Важно, что возникает последовательность атомов. Ферменты, которые гидролизуют липиды, называются *липазы*. Они обладают разной специфичностью.

Главная функция триацилглицеридов – запас энергии. При этом вся энергия содержится в жирных кислотах. Чтобы начать ее извлекать, в первую очередь нужно гидролизовать триацилглицерин под действием липаз.

Таблица 7.1 Жирные кислоты

Количество атомов углерода	**Название кислоты**
1	Муравьиная (формиат)
2	Уксусная (ацетат)
3	Пропионовая (пропионат)
4	Масляная (бутират)
5	Валериановая (валерат)
6	Капроновая
8	Каприловая
10	Каприновая
12	Лауриновая
14	Миристиновая
16	Пальмитиновая
18	Стеариновая
20	Арахиновая

Существуют также непредельные жирные кислоты (с двойными связями).

Две системы обозначения

1. Δ.

Δ обозначает, что двойная связь отсчитывается от карбоксильной группы. В данном случае:

$$\Delta^n - C_n = C_{n+1}$$

2. ω

При ω начинается счёт с конца. Первый номер присваивают концевой метильной группе.

Наиболее распространенные непредельные жирные кислоты:

- C18 Δ^9 – олеиновая кислота.
- C16 Δ^9 – пальмитолеиновая кислота.
- C18 $\Delta^{9,12}$ – линолевая кислота.
- C18 $\Delta^{6,9,12}$ γ - или C18 $\Delta^{9,12,15}$ α - – линолеиновые кислоты.

Разделение жиров и масел:

1. Жиры животного происхождения, масла – растительного.
2. Масло при комнатной температуре жидкое, жир – твёрдый.

Чем больше число атомов углерода, тем выше температура плавления. Чем больше число кратных связей, тем ниже температура плавления. Растительное масло содержит жирные кислоты, среди которых присутствуют короткоцепочечные и много кратных связей. Жиры содержат остатки жирных кислот длиннее. Прогорание масла – окисление двойных связей. Масло и жир – запасные липиды.

В отличие от триацилглицеридов, фосфоглицерины и сфинголипиды – строительные липиды, не рассматриваются как топливо. Отработанный фосфоглицерид будет утилизирован с приобретением энергии, но в норме эти липиды не используются как источник энергии.

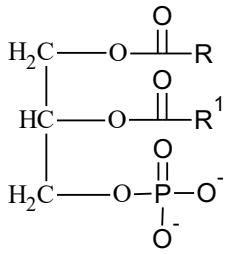


Рис 7.2 Общая формула строения липидов

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Первые два атома углерода связаны с жирными хвостами длинными, третий образует полярную голову и здесь в случае глицеридов присутствует фосфатная группа. Это очень важный метаболит. Его нет в высоких концентрациях в организме, но в небольших количествах он всегда присутствует. Это ключевая точка, от которой можно двигаться как в сторону фосфолипидов, так и в сторону триацилглицеридов. Называется ***фосфатидат*** или ***анион фосфатидной кислоты.***

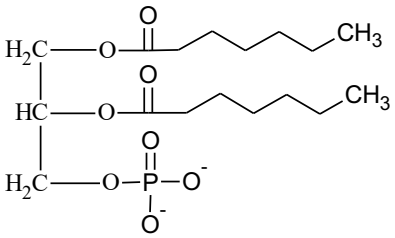


Рис 7.3 Фосфатидат

Имеет бифильную природу. Фосфатидат не выполняет строительную функцию сам по себе, он является предшественником фосфолипидов. При модификации полярной головы (фосфатной группы) образуются важные соединения. Рассмотрим примеры таких модификаций. Самая распространённая из них – ***остаток этаноламина.***

Получается **кефалин** (фосфатидилэтаноламин).

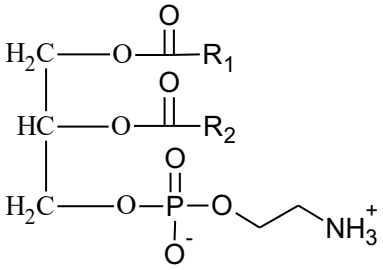


Рис 7.4 Строение кефалина

Кефалины – это группа соединений, могут иметь различные жирные кислоты.

Другая очень распространённая голова – трижды метилированный этаноламин (холин). Образуется ***лецитин*** (фосфатидилхолин)**.**

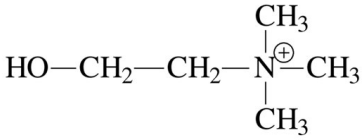


Рис. 7.5 Строение холина

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Еще одна полярная голова – серин. Она присутствует в *фосфатидилсерине.*

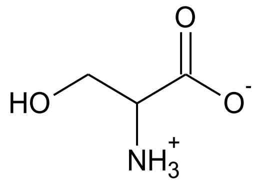


Рис 7.6 Строение серина

И производная шестиатомного спирта – ***инозит.***

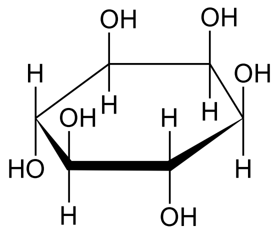


Рис 7.7 Инозит

При более сложной модификации образуется производная с двумя фосфатными группами. Например, четырехвостый фосфолипид – ***кардиолипин.***

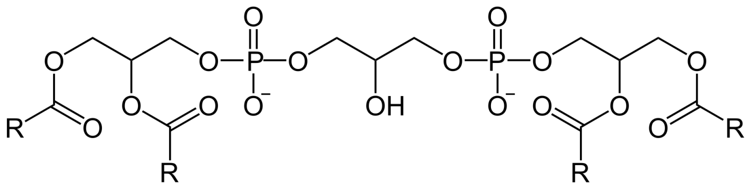


Рис 7.8 Строение кардиолипина

Его в мембранах намного меньше, чем кефалина и лецитина. Фосфоглицериды – основной компонент биомембран**.**

Сфинголипиды

Построены так же как и фосфоглицериды, но с небольшим отличием.

Основой для сфинголипидов является *сфингозин.*

$$CH_3\text{-}(CH_2)_{12}\text{-}CH{=}CH\text{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}\text{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}\text{-}CH_2OH$$

Рис 7.9 Строение сфингозина

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

После добавления второй хвоста через амидную связь получается вещество ***церамид.***

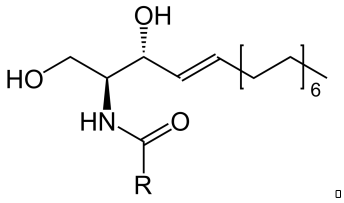


Рис 7.10 Строение церамида

Голова добавляется через фосфатную группу, например, добавляется холин и получается ***сфингомиелин.***

Рис 7.11 Строение сфингомиелина

Зачастую вместо головы добавляются сахара (например, фруктоза или галактоза), тогда получаются цереброзиды.

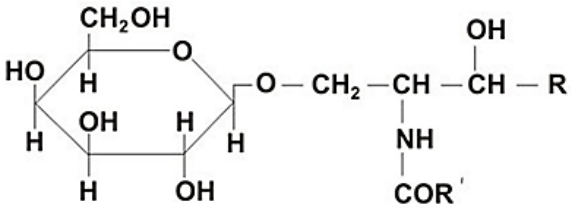


Рис 7.12 Строение цереброзидов

Также могут быть развлетвленные олигосахариды, тогда семейство будет называться ганглиозиды. Они в значительной степени определяют группу крови.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

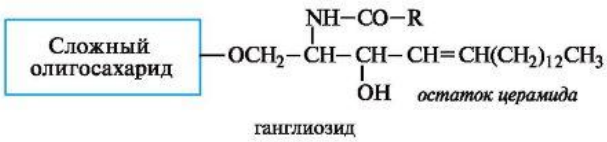


Рис 7.13 Строение ганглиозида

Гликолипиды являются зачастую «антеннами», маркерами клетки.

Холестерин

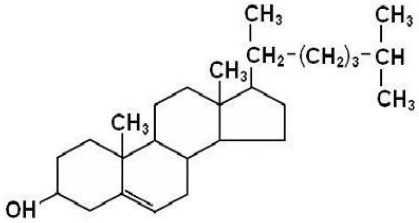


Рис 7.14 Строение холестерина

Это вещество бифильной природы. Имеет неполярную часть, отличающуюся от жирных хвостов, и ОН группу, определяющую полярность. В организме часто встречаются эфиры. Они полностью неполярны.

Биомембраны

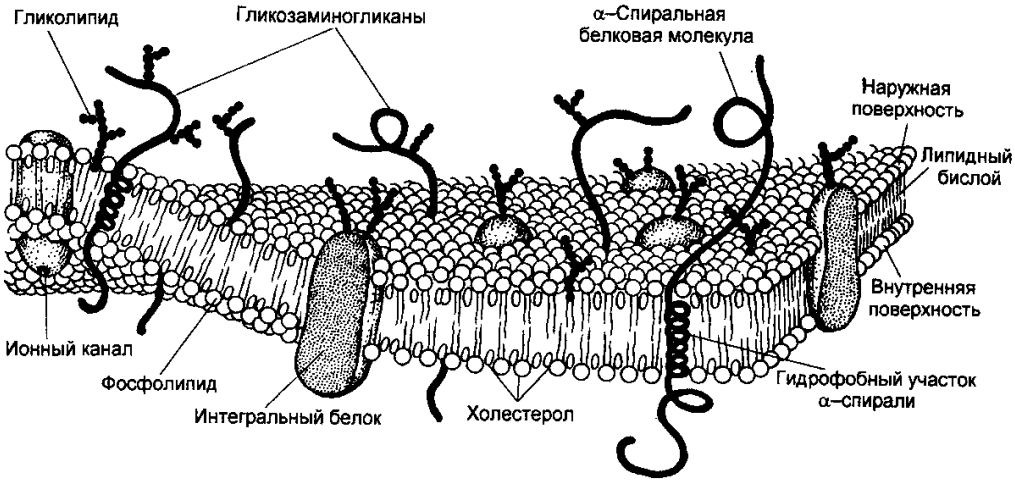


Рис 7.15 Строение биомембран

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Существуют благодаря гидрофобным взаимодействиям. Получается замкнутая структура с внешним и внутренним слоем. С обоих сторон полярные головы. Хвосты направлены друг на друга, так называемый би-слой. Основная функция би-слоя – барьер. В результате ионный состав внутри отличный от того, что снаружи. Внутренний слой проще, внешний более сложный. Мембрана вязкая, но текучая, и в рамках монослоя могут перемещаться как липиды, так и прочие компоненты. Такая подвижность в рамках слоя называется *латеральной диффузией*. Переход из одного слоя в другой запрещен. Этот процесс называется *флип-флоп* и происходит очень редко (из-за сложности при переносе заряженной головы через неполярный слой). В мембране присутствует большое количество разнообразных белков.

Ключевое отличие *липосомы* и *мицеллы* в том, что мицелла представляет собой монослой. Если хвост один, то голова получается большая. Создав мицеллу, можно экранировать хвосты. Если хвоста два, то сечения хвостов получаются больше в неполярной части, и если делать мицеллу, то будут просветы и контакты с водой. Необходимо создавать би-слой.

У транспортного белка зачастую есть центр связывания, который по антенне распознает нужную клетку. Белки бывают двух типов – *интегральные* и *периферические*. Они держатся в мембране за счет гидрофобных взаимодействиий. Используются как транспортные системы. Барьер проницаем для небольших молекул не ионной природы, а для заряженных веществ является преградой. Присутствует холестерин. Он необходим, чтобы расширить температурный интервал, когда мембрана жидкая.

Холестерин – это жесткие неполярные кольца, способствует существованию мембран в области повышенных температур. Холестерин нарушает регулярную укладку хвостов, поэтому нужно опускать температуру, чтобы переходить в гелеобразное регулярное состояние.

Типы транспорта:

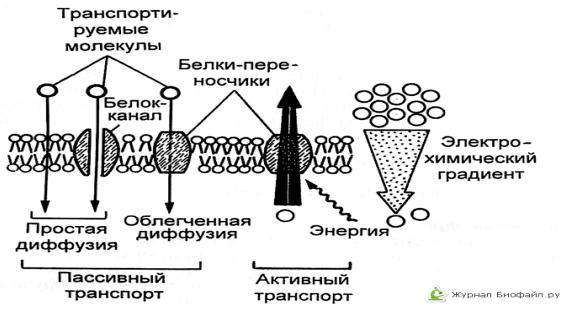


Рис 7.16 Типы транспорта

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Простая диффузия: для веществ маленьких, неполярных или полярных суммарно незаряженных.

Для остальных веществ требуется облегченный траснпорт через канал или транслокационную сеть. Активный транспорт требует энергию АТФ. По направлению делятся на: унипорт, ко-транспорт, в одном направлении – сим-порт, в разные – анти-порт.

Внутри клетки (превалирует калий, магний и фосфат) ионный состав отличается от того, что снаружи (натрий, кальций и хлорид). В первичном океане превалировали калий и магний (сейчас хлорид натрия с добавлениями).

Гипотеза биофизиков: в первичном океане зарождались белки, простейшие ферменты, появилась специфичность к ионам калия, магния и фосфата, но дальше состав первичного океана стал меняться на состав вторичного (нынешнего). Нужно было либо перестраивать ферменты, либо оградить ферменты и оставить их как есть. Это сущность барьера.

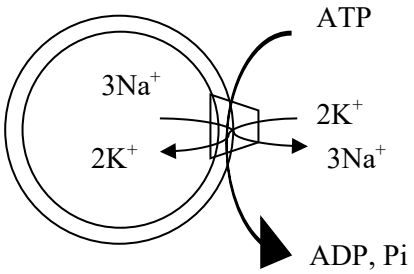


Рис 7.17 Калий-натриевый канал

У организма есть защитный механизм – натрий-калиевая помпа. Этот белковый агрегат забирает изнутри 3 иона натрия и выбрасывает наружу, дальше идёт гидролиз АТФ до АДФ и фосфата, после этого меняется конформация, 3 натрия выбрасываются наружу, а внутрь входят 2 иона калия. Это позволяет добиться поддержания аномального состава. Однако долго так продолжаться не может – возникнет потенциал по обе стороны мембраны. Можно организовать симпорт, который будет возвращать 1 ион натрия внутрь.С точки зрения поддержания состава это возможно, но это является не очень рациональным использованием насоса.

Молекулярные насосы распространены в природе, например, желудочный сок обогащен HCl, соляная кислота образуется благодаря насосу.

Лекция 8

Регуляция гликолиза

Глюкоза превращается необратимо в глюкоза-6-фосфат, дальше обратимо получается фруктозо-6-фосфат, вторая запусковая стадия – фруктозо-1,6-дифосфат, идёт альдолазная реакция, в результате которой получается дигидрокси ацетон фосфат и глицеральдегид фосфат, которые взаимопревращаются. Далее следует обратимая реакция NAD^+ до NADH и входит неорганический фосфат. Получается сверхвысокоэнергетическое соединение *фосфоглицероилфосфат*. Оно обратимо превращается в 3-фосфоглицерат, при этом образуется АТФ. Далее реакции протекают с коэффициентом 2. 3-фосфоглицерат превращается обратимо в 2-фосфоглицерат, затем обратимо в 2-фосфоенолпируват, и дальше необратимо с образованием АТФ превращается в пируват.

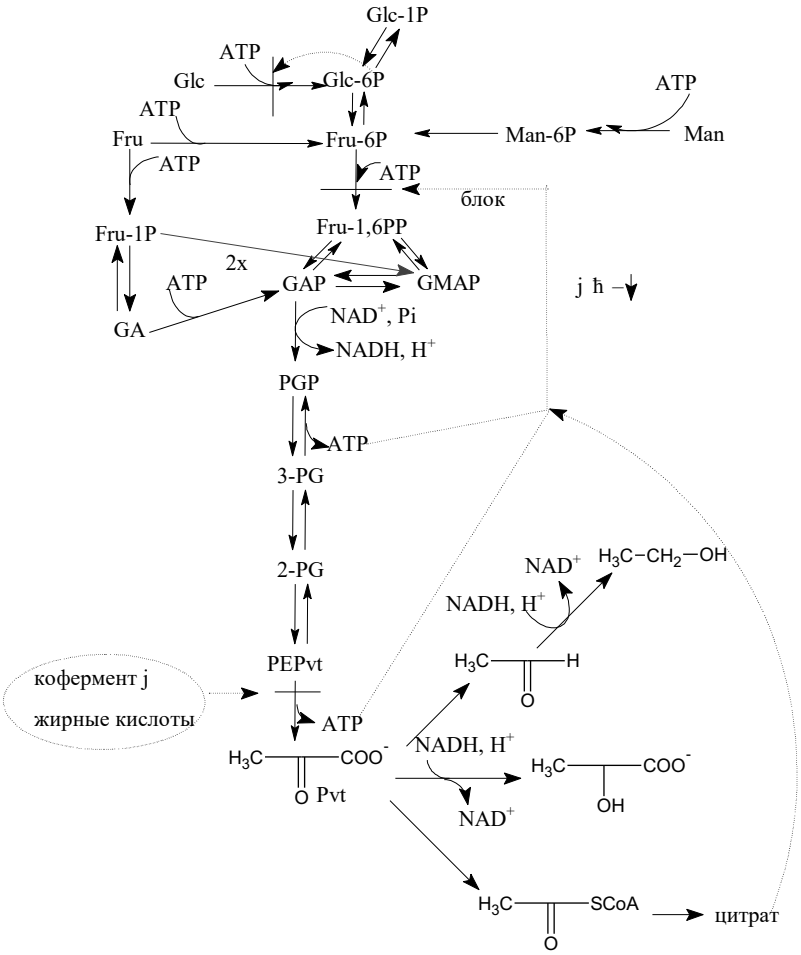


Рис 8.1 Наиболее полная схема гликолиза с регуляторными стадиями

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Декарбоксилирование может идти почти необратимо с образованием ацетальдегида. Дальше идёт процесс регенерации NAD^+ с образованием этилового спирта (спиртовое брожение). Другой вариант: образование NAD^+ может идти сразу с образованием молочной кислоты – лактата. Еще один вариант – превращение в ацетилкофермент А и дальше в цикле Кребса превращение в цитрат.

Главными регуляторными стадиями обычно являются необратимые стадии, потому что на них возможны т.н. обходные пути, если это анаболический процесс.

1 стадия: гексокиназа регулируется непосредственно продуктом.

2 регуляторный пункт – вторая запусковая реакция. Для нее мощным ингибитором будет выступать АТФ.

АТФ, образующаяся на этих двух стадиях, регулирует работу фосфофруктокиназы. Концентрация цитрата тоже является ингибитором. Мощным промоутером является АМФ. Когда возрастает концентрацияя АМФ, это свидетельство того, что в клетке плохое энергетическое состояние, и нужно разлагать углеводы.

Еще одна регуляторная стадия – пируваткиназа, её ингибиторы это ацетилкофермент А и жирные кислоты. Если присутствует много жирных ксилот или эфиров жирных кислот, они замедляют получение энергии. Это регуляторные стадии для самой глюкозы. Для других сахаров, попадающих в гликолиз, есть свои регуляторные стадии. Люди не способны к спиртовому брожению. Лактата образуется в результате аэробного гликолиза.

Животные различаются по способности к анаэробному гликолизу. Анаэробный гликолиз характерен в случае необходимости *спринтерского* усилия (100-200 метров, рывок штанги). Способность к килородному перевариванию всех запасов до CO_2 и H_2O – явный признак *стайерских* усилий. Чем более белое мясо у организма, тем более он зависит от анаэробного гликолиза, а чем более красное мясо, тем большая зависимость от аэробного гликолиза.

Например, курица или крокодил обладают белым мясом и способны лишь на короткие «спринтерские» забеги – им требуется отдых после небольшой нагрузки. Лошадь же имеет красное мясо и способна работать без устали долго, так же как и перелетные птицы (у них темное и жесткое мясо).

Практически любой сахар может вовлекаться в гликолиз. Из **моносахаридов** – фруктоза, галактоза и манноза, из **дисахаридов** – мальтоза, лактоза, сахароза, из **полисахаридов** – крахмал, гликоген.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Крахмал – это полимер остатков глюкозы, соединенных 1,4 α-гликозидными связями. Состоит из линейного компонента – амилозы и разветвленного – амилопектин. Соотношение амилозы и амилопектина в разных источниках приводятся разные – от 1 к 4 до 4 к 1.

Гликоген имеет гораздо больше ветвлений, чем амилопектин. Чем больше разветвлений, тем больше структура похожа на шар. В растительной клетке много места, и есть где хранить запасы, в животной же клетке места мало. Оптимум соотношений площади и объема – это сфера. В каждой клетке есть гликоген в виде шарообразных вкраплений.

Манноза

Чтобы манноза попала в гликолиз, нужно получить маннозо-6-фосфат, затем изомеризовать во фруктозу. Далее путь тот же, что у глюкозы. Если попадается отличный сахар, для него не создается отдельного пути, его пытаются подогнать к существующему с помощью нового фермента.

Фруктоза

Механизм тот же самый, только отсутствует изомеризация – киназная реакция под действием гексокиназы. Из фруктозы получается фруктоза-6-фосфат. Это основной путь для утилизации фруктозы в скелетных мышцах и почках. В печени под действием фруктокиназы идет фосфорилирование за счет АТФ. В результате получается фруктозо-1-фосфат. Дальше деление на две трехуглеродные молекулы (ретро-альдолазная реакция)

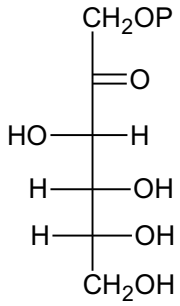


Рис 8.2 Строение фруктозо-6-фосфата

Наверху получается аналог дигидроксиацетона, снизу получается глицериновый альдегид. Далее идет фосфорилирование глицеральдегида за счет триозокиназы. В любом случае тратится 2 молекулы АТФ.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Гликоген

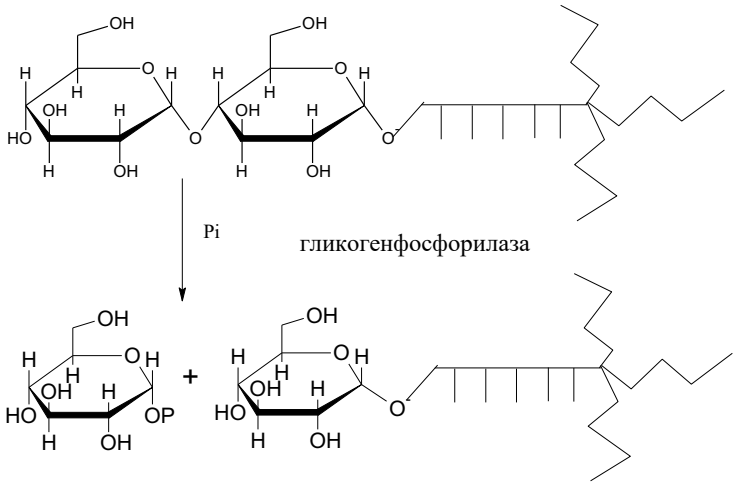


Рис 8.3 Расщепление гликогена

Гликоген – это цепочки из остатков глюкозы, соединенных 1, 4 α-гликозидной связью. Редуцирующим называется сахар, если из циклической формы он может превратиться в линейную, у него появляется альдегидная группа, он может проявлять восстановительную способность, окисляясь при этом и превращаясь в карбоновую кислоту по первому положению (оновую кислоту).

Если потенциально гликозидный радикал занят на образование связи, то этот сахар не вступает в окисление-восстановление, т.к. не может раскрыться. Гликоген обращён вне нередуцирующим 4-ым концом. Иначе гликоген был бы слишком реакционно способным, и в итоге запас не получалось бы сохранить**.** Когда нужна энергия, к гликогену подходит фермент гликогенфосфорилаза, и этот фермент катализирует реакцию, в результате которой с нередуцирующего конца отщепляется 1 остаток глюкозы в виде глюкозо-1-фосфата, а данная цепь гликогена становится на 1 звено короче. В данном случае АТФ не присутствует, реакции протекают под действием неорганического фосфата. Здесь слабо положительная ΔG, равновесие сдвинуто в сторону отщепления.

Из гликогена получается глюкозо-1-фосфат. Происходит изомеризация из 1 фосфат в 6 фосфат. Реакция называется *мутазной*, когда переносится группировка. Фермент, катализирующий эту реакцию, фосфоглюкомутаза.

Два механизма для работы мутазы

Первый связан с тем, что у фермента есть фосфорилированный остаток серина, к нему приходит глюкозо-1-фосфат, и в результате фосфатная группа переносится, серин остаётся без фосфата, и получается глюкоза 1,6-дифосфат.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

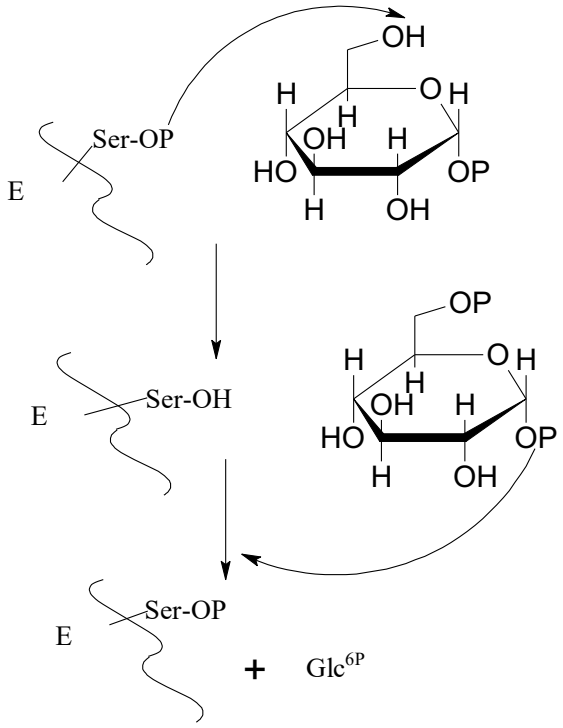


Рис 8.4 Действие фосфоглюкомутазы

После чего на следующей стадии фосфатная группа переносится на серин, регенерируется фермент, и получается глюкозо-6-фосфат.

Второй вариант: в качестве кофактора выступает глюкоза 1,6-дифосфат.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 9

Строение клетки

Согласно общепринятой сейчас трёхдоменной системе Карла Вёзе (1977) все клетки делятся на три трипа – *бактерии, археи и эукариоты*. В учебниках, написанных в середине 80-х годов, археи еще не упоминаются. Детали, указывающие на время расхождения всех трех видов друг от друга, еще не прояснены.

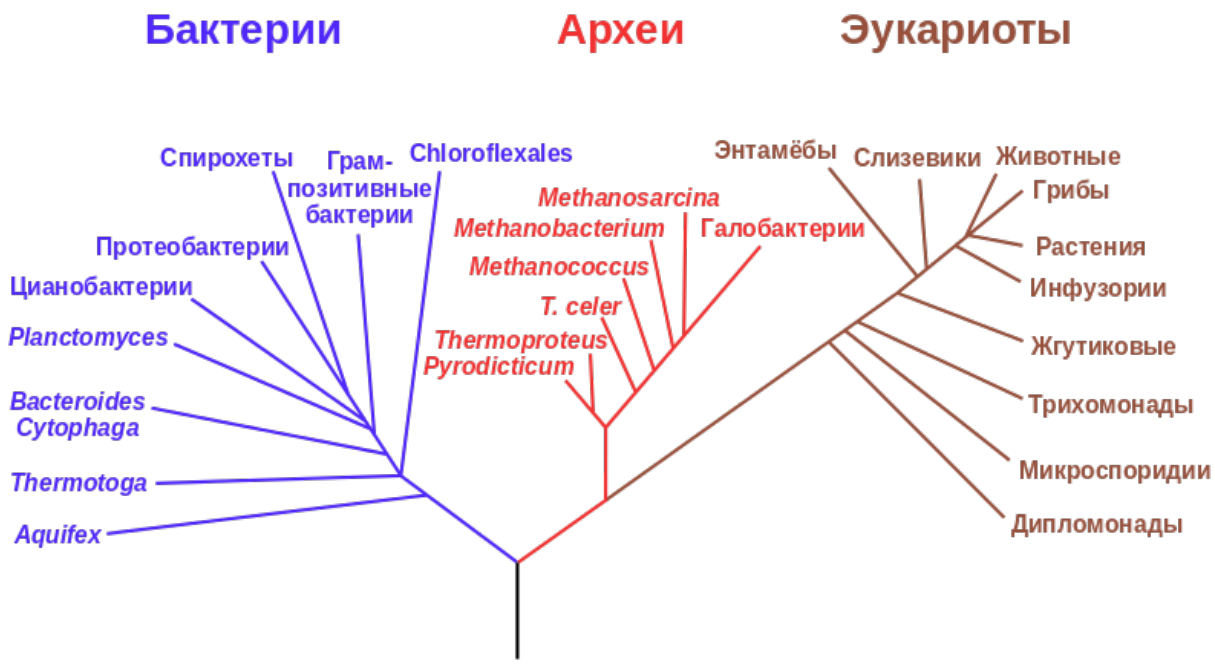


Рис 9.1 Трёхдоменная система Карла Вёзе

Эта система построена на сравнительном анализе последовательностей ДНК, которая кодирует малую рибосомную РНК, входящую в состав рибосомы. Это консервативная последовательность, она похожа у всех видов, независимо от того, как далеки они друг от друга.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

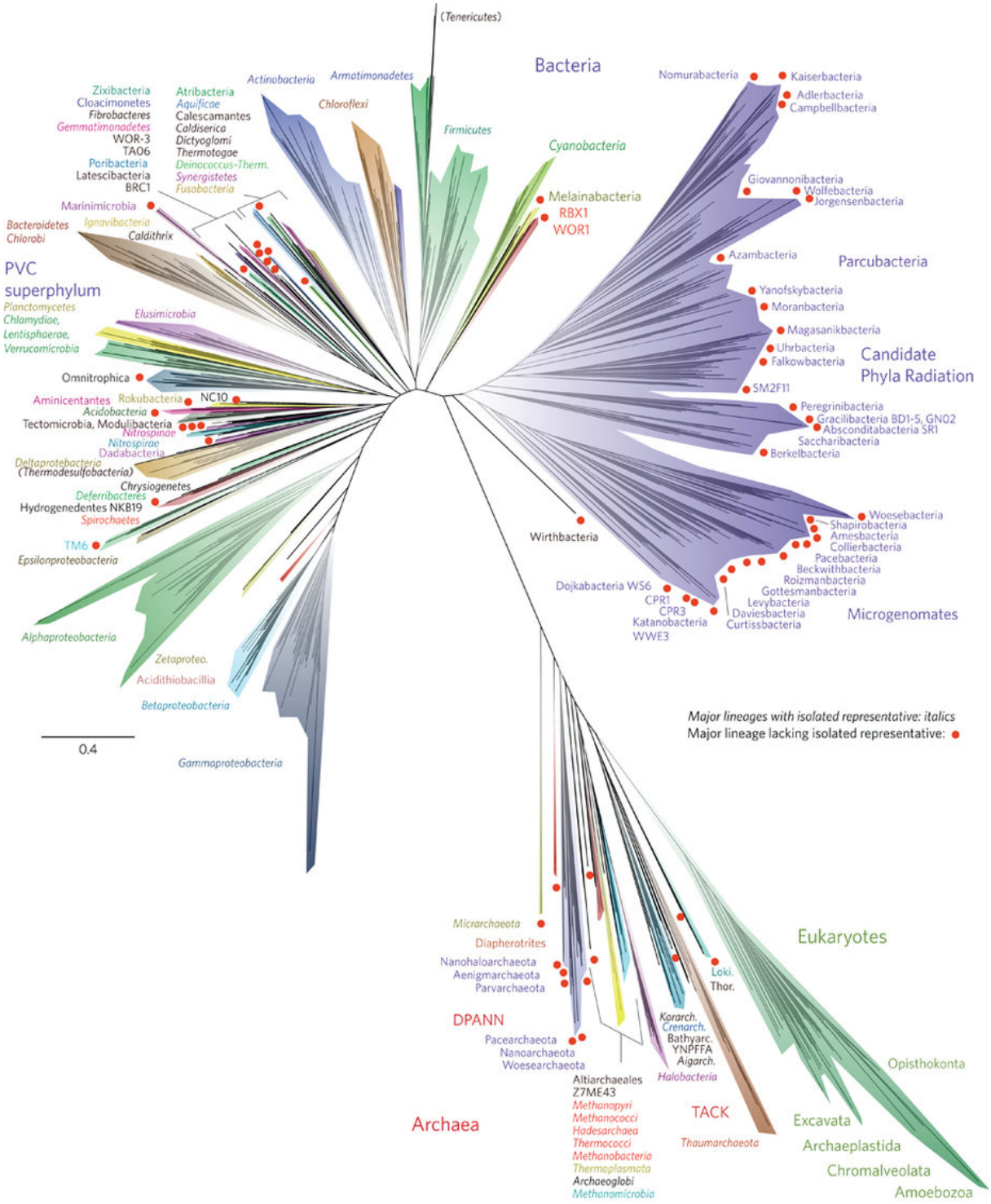


Рис 9.2 Эволюционное древо

Большая часть – бактерии, внизу археи и эукариоты. Это «дерево» построено по самым последним данным, суммированы все последовательности 16 rs РНК, которые

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

были секвенированы на сегодняшний день. Для бактерий разных видов очень сильны различия, археи и эукариоты близки друг к другу.

Самое фундаментальное различие между бактериями и археями с одной стороны и эукариотами с другой стороны – это наличие оформленного клеточного ядра. Существует гипотеза, что клеточное ядро сформировалось в результате эволюции.

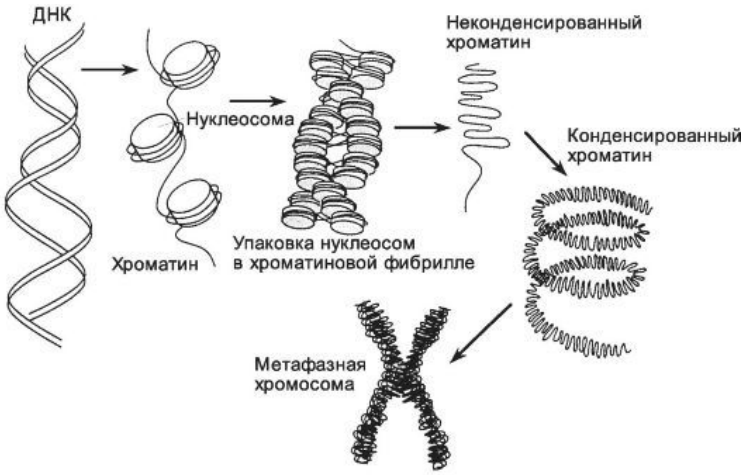


Рис 9.3 Процесс скручивания ДНК в хромосому

Условная схема, что кольцевая ДНК в бактериях или археях была прикреплена к выпячиванию мембраны, постепенно мембрана разрасталась и захватила ДНК, и образовалось ядро. Кроме того, ДНК в бактериальной клетке и эукариотической различаются внешне. В эукариотах ДНК упакованы в хромосомах. Это очень плотные, компактные образования, тогда как в бактериях и археях – кольцевая простая молекула ДНК.

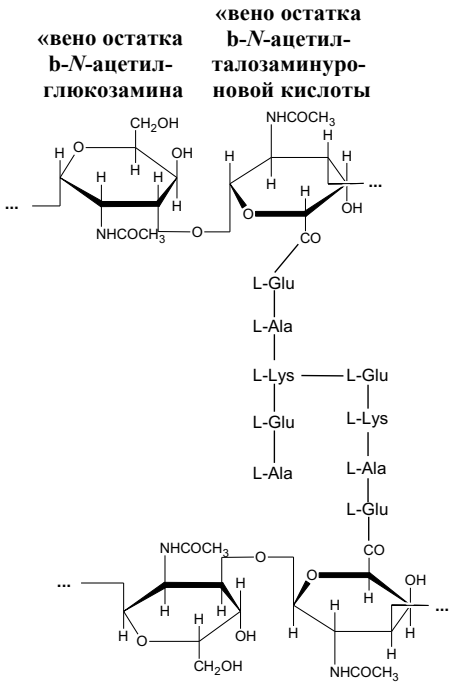
Бактерии и археи

У бактерий и у архей нет оформленного ядра и мембранных органелл. У бактерий и у архей гены считываются не по одиночке, а целой группой, под управлением одного промоутера. Эти группы называются **опероны**, а получающаяся маточная РНК – полицистронной мРНК. Размер клеток порядка 0,1-10 мкм, более чем в 100 раз меньше, чем у эукариот.

У архей есть особенности строения, отличающие их и от бактерий и от эукариотов. У них есть клеточная стенка, построенная из совсем других углеводов (муреин у бактерий, псевдомуреин у архей)

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

—троение клеточной стенки
архей



—троение клеточной стенки
бактерий

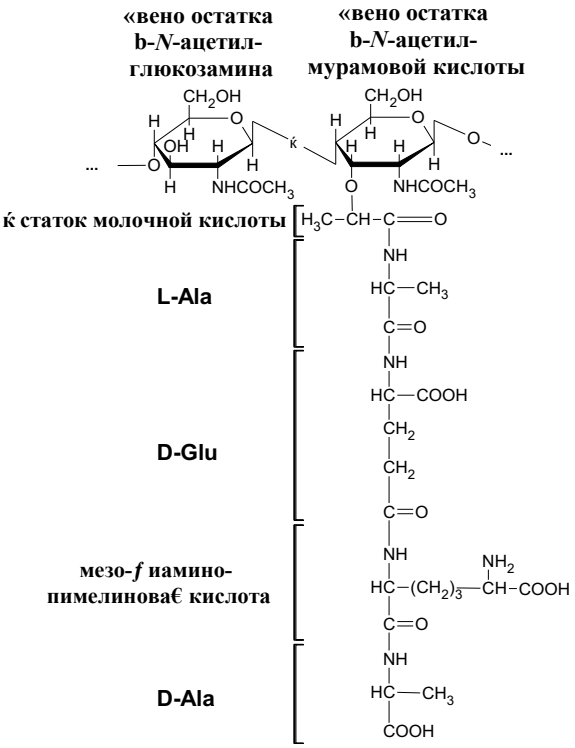


Рис 9.4 Сравнение клеточной стенки архей и бактерий

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Кроме того, в клеточной стенке, в липидах мембраны есть простая эфирная связь в отличие от бактерий, в клеточной стенке которых присутствует сложноэфирная. Соответственно, в археях отсутствует фермент синтаза жирных кислот, которая отвечает за синтез ненужных им жирных кислот. В некоторых археях встречаются интересные мембранные структуры – не би-слой, а двуполярные липиды, одна головка которых смотрит во внеклеточное пространство, а другая – во внутриклеточное.

Эукариоты и археи

У архей ДНК связана с гистонами – это уже следующий этап эволюции. Когда ДНК не просто кольцевая, а она начинает компактизироваться, но не закручивается в хромосомы. Трансляция начинается с метионина.

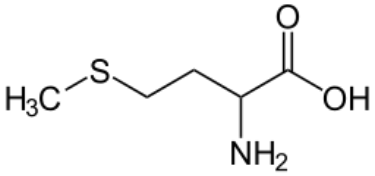


Рис 9.5 Метионин

У архей есть интроны, и РНК, которая считывается изначально, незрелая, ей нужен процессинг РНК.

Эукариотические клетки можно разделить на две большие группы – *животные* и *растительные* клетки. Он похожи друг на друга содержимым, у них практически одинаковые органеллы. У растительных клеток нет центриолей. *Центриоли* – структуры из микротрубочек, участвующие в образовании веретена деления. У растительных клеток есть клеточная оболочка, которая делает структуру твёрдой, вакуоли и пластиды.

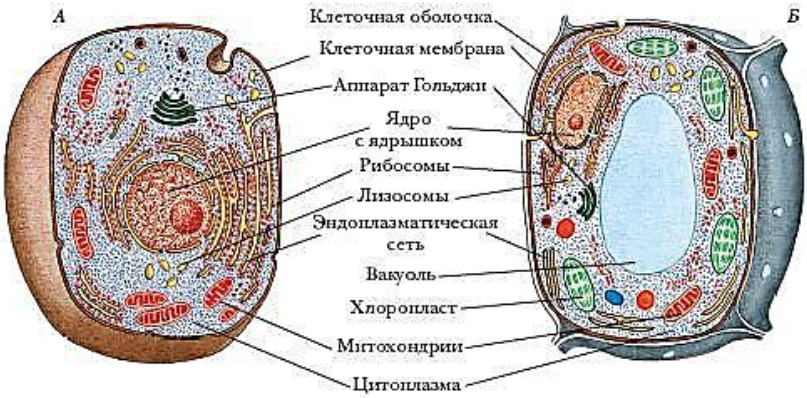


Рис 9.6 Сравнение строения животной и растительной клеток

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Органеллы клетки

В сумме органеллы составляют примерно 50% объема клетки. Как правило, среди органелл большую долю занимают митохондрии. Компартменты органелл окружены мембранами, и эти мембраны играют важнейшую роль, и этой ролью определяется размер.

Ядро – самая центральная и самая важная часть клетки, т.к. в ядре содержится ДНК, она окружена двумя мембранами. Внешняя мембрана переходит в мембрану эндоплазматического ретикулума, у них общее межплазматическое пространство. В ядре с ДНК считывается матричная РНК, а белки с матричной РНК синтезируются в цитозоле. Ферменты, участвующие в процессах, синтезируются в цитозоле, а работают внутри ядра, поэтому нужна гибкая и точная система транспорта. Ядро имеет большое количество пор для совершения этого обмена. В этих порах находятся большие **поровые комплексы.** Это порядка 30 различных видов белков, и каждый из этих белков входит в 16-ти копиях. Имеют форму правильного восьмиугольника, симметричны со стороны цитозоле и ядра.

Общая молекулярная масса (NPC) – 125 млн. D.

Некоторые домены белков, составляющие эти поры, находятся в неупорядоченном развернутом состоянии, и эти «клубки» закупоривают внутреннее пространство поры и мешают свободной циркуляции веществ между цитоплазмой и ядром. Лишь небольшие молекулы (до 5 тыс. D) могут свободно проникать. Б*о*льшие молекулы нуждаются в транспортёрах. Это особые белки, распознающие специальные сигнальные последовательности на молекулах. Они связываются с ними и диффундируют к этим поровым комплексам. Есть рецепторы импорта и экспорта.

Синтез белка происходит в цитоплазме, за это отвечают молекулярные машины, присутствующие во всех организмах, – **рибосомы**. Рибосомы – это не органеллы, это надмолекулярный комплекс РНК и белков. Они отличаются для эукариот и прокариот. Всегда имеют две субъединицы, транспортирующиеся в цитозоль и соединяющиеся на мРНК.

Эндоплазматический ретикулум – это одномембранная органелла, которая сообщается своим внутренним пространством с внешней мембраной ядра.

Рис 9.7 Эндоплазматический ретикулум

Транспорт белка в ЭПР

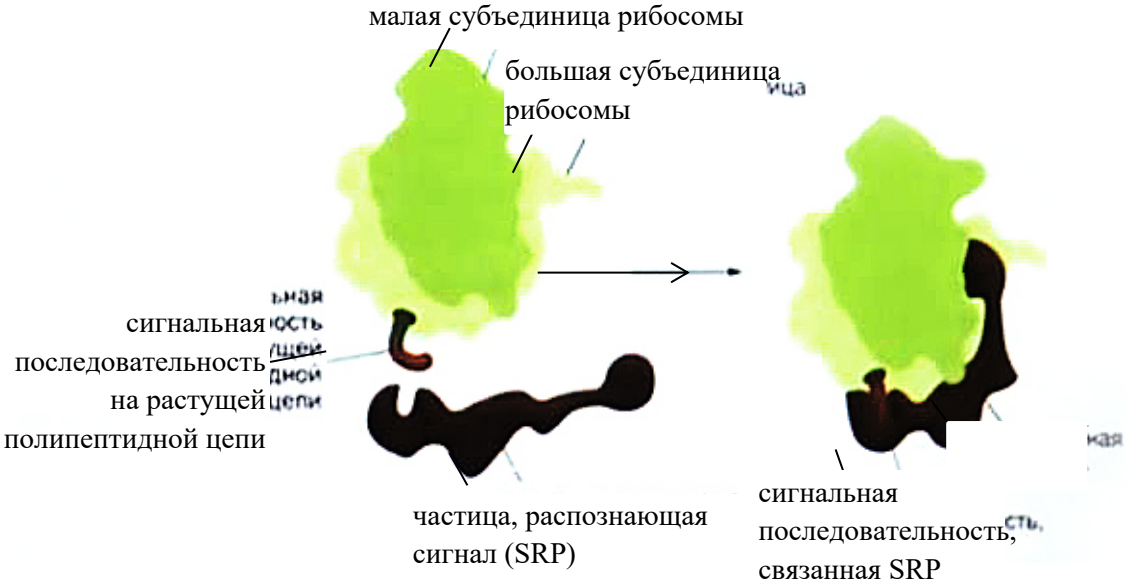


Рис 9.8 Транспорт белка в ЭПР

Матричная РНК встречается с рибосомой, синтез белка начинается с N-конца. После синтеза области, содержащей сигнальный участок, плавающая в цитоплазме частица распознает эту область и связывается с ней. У этой частицы есть хвост, который цепляется к другому концу рибосомы и блокирует трансляцию. Белок больше синтезироваться не может. Эта частица доставляется к ЭПР, там она связывается с белком переносчиком, помещает синтезированную часть в пору, а сигнальная последовательность отрезается специальным ферментом. Рибосома синтезирует белок, и он попадает во внутреннее пространство ЭПР.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

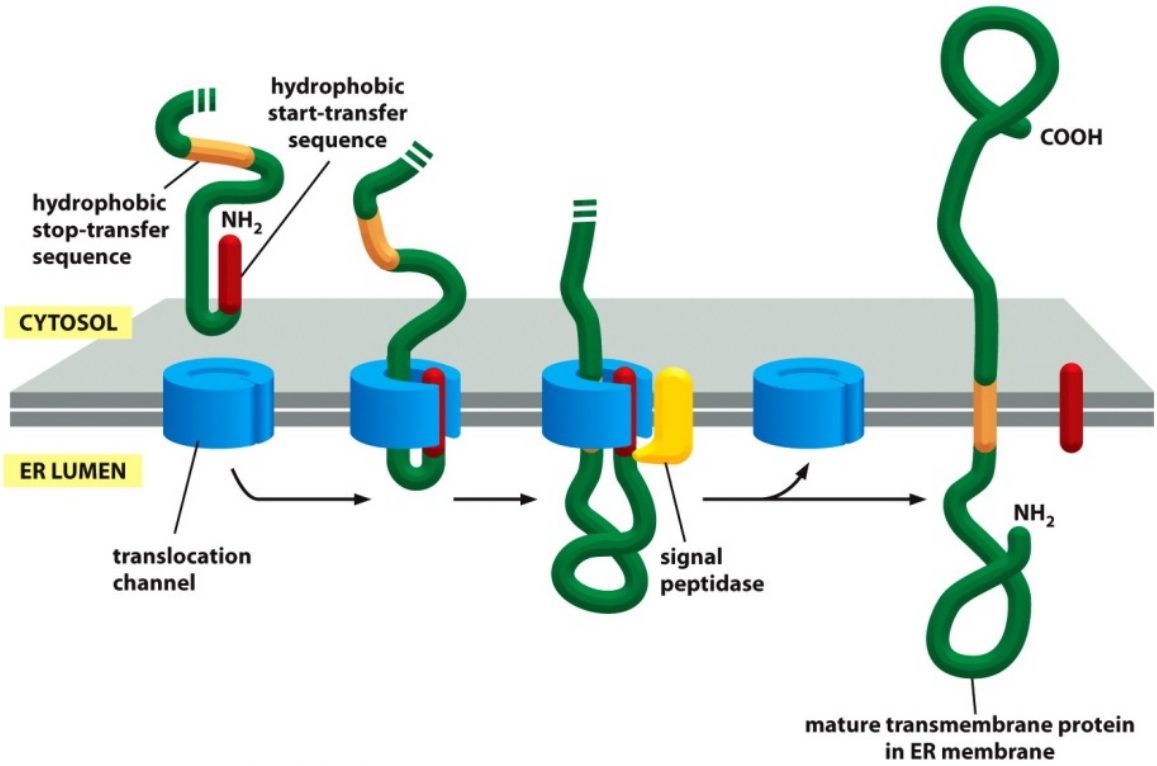


Рис 9.9 Проникновение в пору

Белки могут встраиваться в мембрану при помощи специальной последовательности, тормозящей прохождение через мембрану.

Фолдинг белка в ЭПР

Важной функцией ЭПР является правильное сворачивание белка. (Примерно 80% белков сворачиваются неправильно, выбрасываются в цитоплазму и деградируют).

Как только происходит синтез, прикрепляется олигосахарид. Он является маркером протекания фолдинга. Есть особый фермент – *шаперон*, проверяющий правильность свёртывания белка, при неправильном свертывании он добавляет глюкозу. Шаперон способствует правильному сворачиванию белка и продолжает сворачивать белок, если обнаруживает глюкозу. Если какой-то белок сворачивается очень долго, то фермент успевает отрезать сахар, и он уходит.

Есть *шероховатые* и *гладкие* ЭПР. Главная функция гладкого ЭПР – биосинтез липидов.

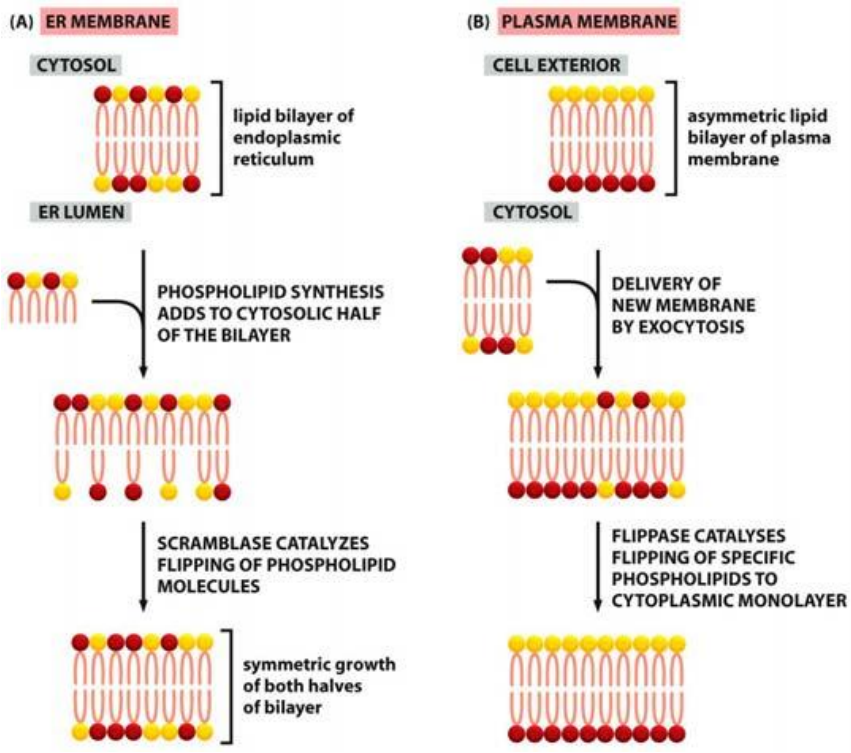


Рис 9.10 Синтез мембран

Липиды нужны для всех мембран, большая часть липидов синтезируется в ЭПР. Основные липиды, которые производятся в ЭПР – это *лецитин*, *холестерин*, *церамид*, *сфингозин*. Все ферменты, отвечающие за биосинтез липидов, расположены на цитоплазматической стороне ЭПР. Когда липиды синтезируются, они встраиваются во внешний слой, и возникает дисбаланс. Фермент скрамблаза катализирует флип-флоп перескок с одной стороны мембраны на другую. В мембране всей клетки наоборот нужно поддерживать разный состав липидов с двух сторон. Эта мембрана образовывается отпочкованием везикул от ЭПР. Фермент флипаза селективно узнает липиды и располагает их нужным для мембраны образом.

Транспорт из ЭПР в Аппарат Гольджи

У ЭПР две важные функции – *синтез белков*, которые будут либо секретироваться, либо переходить в другие органеллы, и *биосинтез липидов*.

После ЭПР белки в форме везикул переходят в Аппарат Гольджи – сортировочную станцию, где белки окончательно распределяются. Везикулы сливаются в одну большую везикулу неправильной формы. Белки могут проходить напрямую через мембраны, а могут отпочковываться и через внешнюю среду в следующий компартмент. Считается, что эти два процесса идут одновременно. Главное, что происходит в аппарате Гольджи с белками – это гликозилирование.

Гликозилирование – это последовательное навешивание остатков сахаров и формирование уникального паттерна олигосахаридов. В этом участвует много ферментов, каждый из которых специфичен к продукту предыдущей реакции.Гликозилирование нужно для того, чтобы защитить их от протеасомной деградации. Также за счет уникальных комбинаций сахаров достигается узнавание, также сахара мешает белкам агрегировать.

После аппарата Гольджи белки направляются в компартменты, в которые они изначально должны были попасть. Очень важным является компартмент **лизосом.** Туда приходят ферменты, катализирующие гидролиз. Внутри лизосом поддерживается кислая среда, pH порядка 5, что значительно ниже pH цитозоле. Такое различие поддерживается водородными насосами, которые за счет гидролиза АТФ накачивают протоны внутрь. Лизосомы могут быть разных форм и размеров.

Аутофагия. Клетке, даже в норме, нужно постоянно избавляться от тех своих компонентов, которые уже испортились, например, от митохондрий. Существует специальный механизм, который окружает ненужные компартменты мембраной. Происхождение этой мембраны неизвестно. С этой аутофагосомой связывается лизосома, их мембраны сливаются и содержимое лизосомы оказывается внутри, и те, компоненты, которые находились в аутофагосоме, расщепляются и уничтожаются.

Через лизосомы проходит 3 пути деградации: **аутофагия, эндоцитоз** (мелкие молекулы поглощаются из внешней среды, формируют эндосому, которая сливается с лизосомой) и **фагоцитоз** (способ, который используют специальные клетки – фагоциты или макрофаги – когда поглощается большая клетка, заключается в фагосому и переваривается с помощью лизосом).

Пероксисома – органелла, которая представляет собой мембранный пузырёк, в центре которого кристаллическое ядро. Эта органелла отвечает за β-окисление жиров. В пероксисоме содержатся ферменты-окислители, которые, используя кислород, окисляют свои субстраты с образованием пероксида водорода, затем этот пероксид окислят все, что попадает дальше

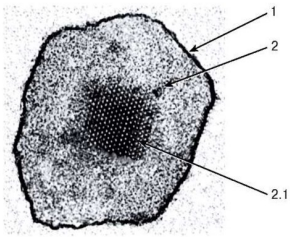


Рис 9.11 Строение клетки. 1 – мембрана, 2 – матрикс, 2.1 – нуклеотид (кристаллоидная сердцевина)

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + R'H_2 \rightarrow R' + 2H_2O$$

Кристаллоидная сердцевина обусловлена большим количеством ферментов – окислителей, которые выпадают в осадок. Например, оксидаза мочевой кислоты.

Важной частью клетки является **цитоскелет,** где *актин* – представляет собой структуру, *миозин* – движение.

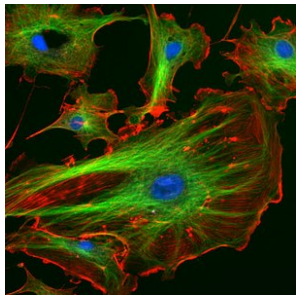


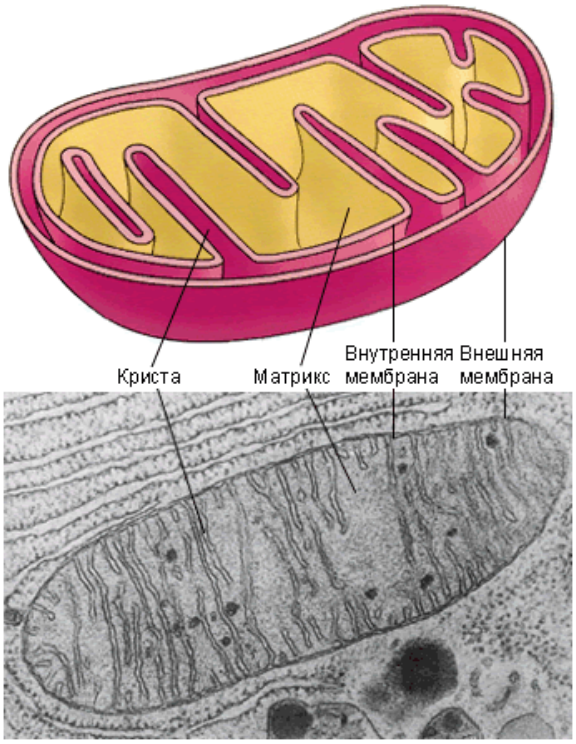
Рис 9.12 Цитоскелет клетки

В животной клетке цитоскелет образован преимущественно актином, который определяет форму клетки. Всё движение в клетке происходит вдоль нитей, образующих цитоскелет.

Растительная клетка содержит то же, что и животная клетка, но имеет некоторые отличительные особенности – *клеточную стенку*, состоящую из целлюлозы, гемицеллюлозы и пектина и обуславливающую форму клетки, вакуоль (занимает большую часть растительной клетки) и плазмодесмы. В вакуоли хранятся питательные вещества, могут утилизироваться ненужные вещества и поддерживается тургор. Например, у галофитов **тургор** – внутреннее давление – может достигать 50 атм.

Плазмодесмы – очень тонкие каналы между соседними клетками для обмена содержимым.

В растительных клетках отсутствуют центриоли, но есть пластиды (хлоропласты, лейкопласты, хромопласты). Каждая из групп лейкопластов ответственна за синтез определенных веществ. Наиболее интересными являются хлоропласты.



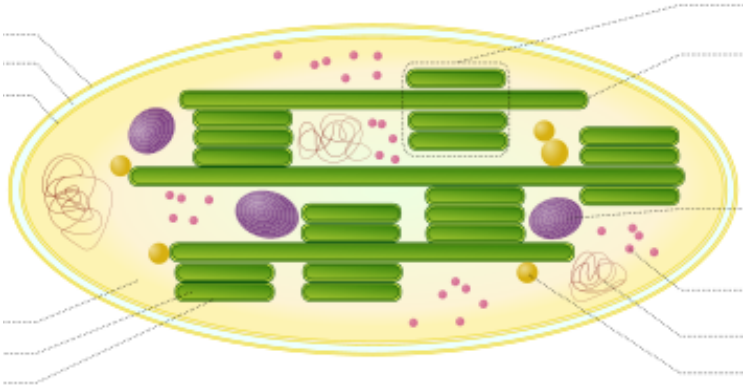


Рис 9.13 Митохондрии и хлоропласт

Митохондрии – органеллы, окруженные двумя слоями мембран, внутренняя мембрана образует впячивания, которые повышают площадь мембран. *Матрикс* – внутреннее пространство мембраны. Внешняя мембрана хорошо проницаема, а внутренняя – нет.

В хлоропластах есть еще один компартмент – это *тилакоиды*. Они эволюционно произошли от внутренней мембраны. И во внутренней мембране митохондрий, и в мембране тилакоидов есть протонные насосы, которые закачивают ионы водорода против их градиента. В митохондриях эти насосы работают вовнутрь, накачивают

протоны в матрикс, а в тилакоидах – наоборот. Митохондрии значительно меньше хлоропластов.

Их объединяет принцип получения энергии. Есть высокоэнергетические электроны, которые в случае фотосинтеза берутся из солнечного света, а в случае синтеза АТФ в митохондриях из пищи. Они по цепи переносчиков движутся по мембране и шаг за шагом отдают энергию. За счет этой энергии осуществляется работа протонного насоса. За счет протонного градиента начинает работать АТФ-синтаза.

Хемиосмос— биохимический механизм, с помощью которого осуществляется превращение энергии цепи переноса электронов в энергию АТФ.

Важным отличием хлоропластов и митохондрий от других органелл является наличие *собственного генетического аппарата,* однако его необходимость не очевидна.

Митохондрии часто прилепляются к другим органеллам, которым постоянно нужны АТФ. У митохондрий есть и другие функции, например, в условиях голода именно там начинается расщепление белка.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 10

Гликоген

Гликоген – основной запасной полисахарид животных – сильно разветвленный полисахарид, и цепочки там представлены 1,4 α-связи между остатками глюкозы с разветвлением 1,6; наружу выступают доступные для утилизации нередуцирующие концы. Гликогенфосфорилаза укорачивает цепочки, АТФ не задействован. ΔG близка к 0 и слабо положительная. Равновесие реакции сдвигается в сторону гидролиза гликогена. Гликогенфосфорилаза укорачивает нередуцирующий конец до тех пор, пока не останется 4 остатка. Здесь приходит 1,6 α-гликозидаза. Она катализирует две реакции, забирает 3 концевых остатка глюкозы и переносит на нередуцирующий конец, тем самым удлиняет его. Звено, находящееся на разветвлении, отщепляется тем же ферментом в виде глюкозы без фосфатов. Все звенья могут быть утилизированы. Главный путь, наблюдающийся во всех органах, связан с тем, что гликогенфосфорилаза превращается в глюкозо-1-фосфат. Необходима фосфоглюкомутаза.

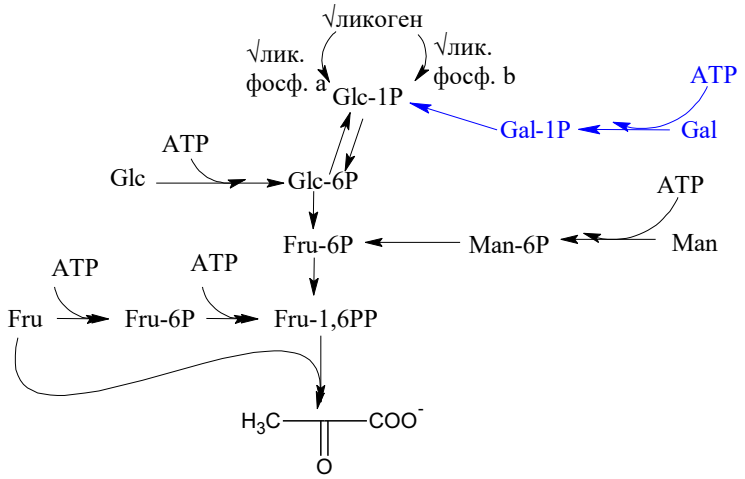


Рис 10.1 Гликолиз с множеством сахаров

Гликогенфосфорилаза

Гликогенфосфорилаза существует в двух базовых формах: гликогенфосфорилаза А (высокоактивна), гликогенфосфорилаза В (почти не активна). Это один и тот же фермент в разных фазах.

Гликогенфосфорилаза А – чаще всего димер, у которого есть два остатка серина. Под действием фермента киназа фосфорилазы идёт реакция АТФ до АДФ. Фермент переходит в другую (фосфорилированую) форму и таким образом фосфорилируется.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

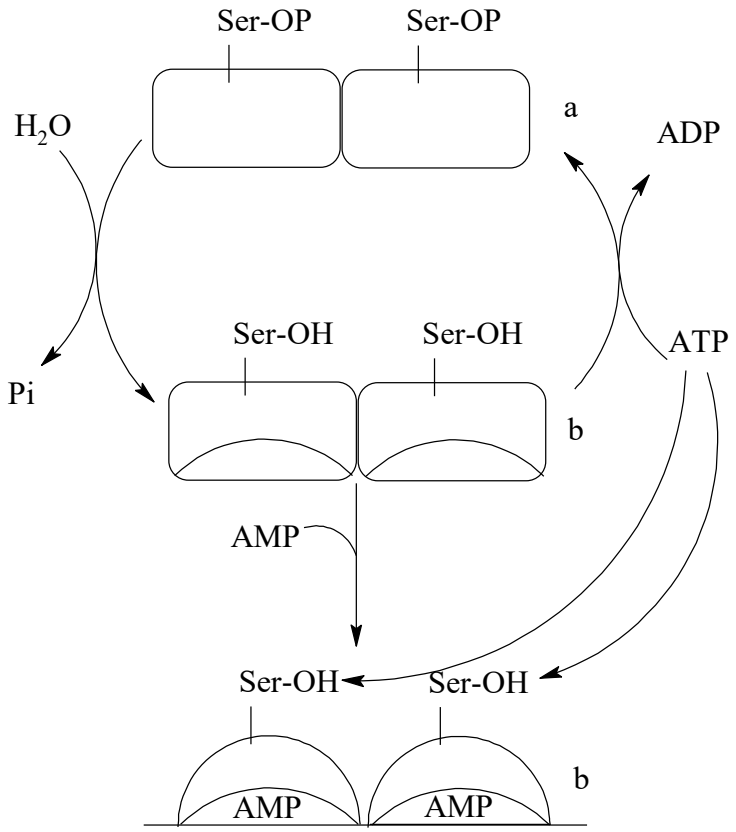


Рис 10.2 Гликогенфосфорилаза

Переход из неактивной формы в активную осуществляется через фосфорилирование остатков серина. Первый пример, когда фосфорилирование определяет высокую активность фермента. Это регуляция на уровне механизма обратной связи. Активация происходит, когда нужна энергия. Гормональная регуляция идёт за счет адреналина и частично инсулина. При необходимости деактивировать фермент приходит фосфатаза фосфофосфорилазы (отщепляет гидролитическую фосфатную группу). Это универсальный механизм, но есть и другие. Гликогенфосфорилаза содержит по одному центру связывания и этот центр принимает на себя АМФ, и в результате даже с нефосфорилированым серином может получаться активный фермент, если будет присутствовать АМФ. Когда энергии мало, то есть много АМФ, которая связывается с гликогенфосфорилазой, остатки серина становятся доступны для фосфорилирования под действием киназа фосфорилазы. Чтобы активировать фермент, нужно тратить 1-2 молекулы АТФ. Когда концентрация АТФ начинает расти, АТФ блокирует эти участки, не дает АМФ связываться и происходит деактивация.

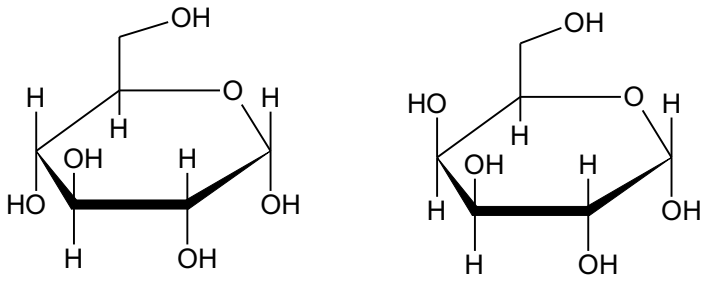
АМФ является мощным промоутером, а АТФ является блоком.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Глюкагон

Глюкагон – полипептид, вырабатывающийся в поджелудочной железе. Инсулин понижает глюкозу, а глюкагон приводит к увеличению её концентрации. Если в крови концентрация глюкозы падает, то через глюкагон запускается гликогенфосфорилаза печени, она разлагает гликоген до глюкозы (процесс без фосфоризации). Эта глюкоза с кровью разносится по организму.

Основная проблема галактозы в том, что её хвост отличатся от глюкозы, фруктозы и маннозы.



√люкоза √алактоза

Рис 10.3 Схема превращения галактозы в глюкозу-1-фосфат

Разница в четвертом положении. Галактоза имеет высокий активационный барьер.

У организма есть механизм – если какая-то простая реакция защищена барьером, то это вещество переносится на более крупную молекулу, и за счет резонансных форм и распределения можно разложить барьеры на более низкие.

Галактоза на первом этапе под действием галактокиназы превращается в галактоза-1-фосфат (при вылете АДП). Она встречается с УДП глюкозой.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

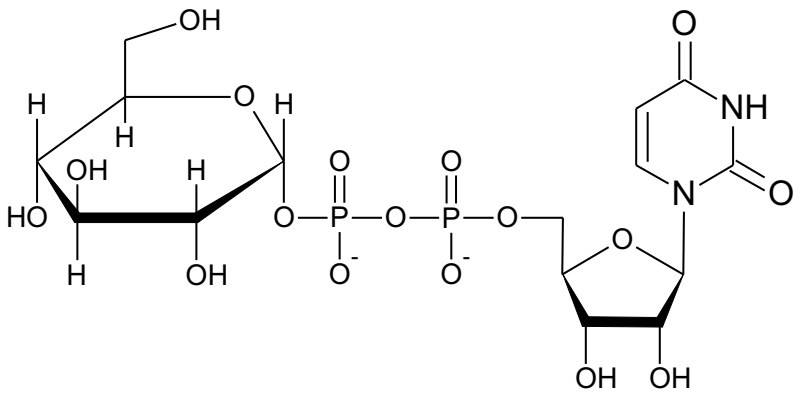


Рис 10.4 Строение УДП глюкозы

Уходит глюкозо-1-фосфат, и остается УДП галактоза. В составе большой молекулы происходит эпимеризация, и УДП галактоза превращается в УДП глюкоза. *Галактоземия* – патологическая непереносимость лактозы. Не следует путь с непереносимостью лактозы, которая распространена, например, у некоторых южных вследствие отсутствия лактазы.

УДП глюкоза встречается с PPI, далее уходит УТФ и остается глюкозо-1-фосфат. Концентрация галактозо-1-фостфат и глюкозо-1-фосфат находится примерно на одном уровне.

Галактоза за счет АТФ фосфорилируется под действием галактокиназы – получается галактоза 1 фосфат, которая через несколько стадий превращается в глюкозо-1-фосфат. Далее идёт мутазная реакция.

Гликолиз является первым предподготовительным этапом биохимического дыхания. Гликолиз – регуляторный процесс. Когда кислорода недостаточно – образуется лактат или этанол, когда кислород есть – процесс идет вплоть до CO_2 и H_2O.

В результате гликолиза образуется две молекулы АТФ. Процесс должен идти до образования лактата. ΔG составляет -47 ккал/моль. ΔG пути от глюкозы до CO2 и H2O – -686 ккал/моль. В процессе гликолиза – менее 10 процентов энергии, которая есть в этой глюкозе. В продуктах гликолиза сохраняется много энергии, и в условиях нормального кислородного снабжения процесс идет дальше

$$Glc \longrightarrow \text{лактат} \quad -47 \text{ ккал/моль}$$

$$Glc \longrightarrow CO_2 + H_2O \quad -686 \text{ ккал/моль}$$

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

В цикл Кребса попадает предподготовленный пируват. Пируват должен превратиться в ацетилкофермент А, и только в таком виде попасть в цикл Кребса.

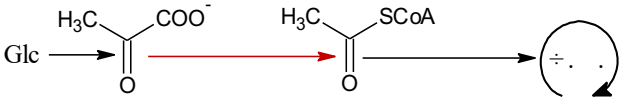


Рис 10.5 Включение глюкозы в цикл Кребса

Для этой цели задействовано три каталитических фермента (E1 – пируватдегидрогеназа, E2 – дигидролипоилтрансацетилаза, E3 – дигидролипоилдегидрогеназа) и два регуляторных. Помимо этого, 5 коферментов: тиаминпирофосфат (B1), липоевая кислота, кофермент А (пантотеновая кислота), NAD 9 – производная никотинамида), ФАД (производная рибофлавина). Это все составляет пируватдегидрогеназный комплекс. В данном случае активность проявляет дефосфорилированный фермент, а не фосфорилированный.

Всё зависит от того, из какого организма выделяют комплекс. Это сферическая частица. По краям фермент E, много субъединиц с торчащим наружу тиаминпирофосфатом, а внутри много E2, из которых торчат «флаги» липоевой кислоты и немного У3, из которых торчит ФАД.

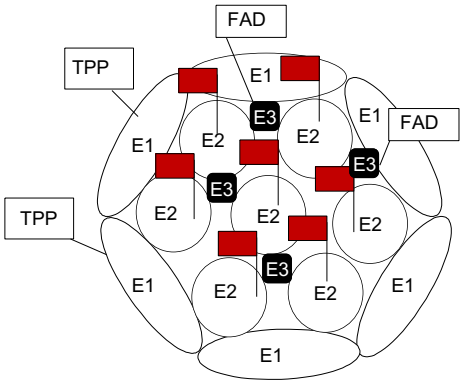
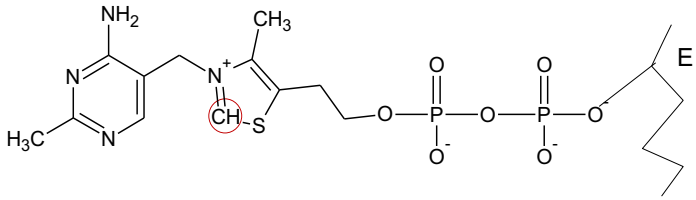


Рис 10.6 Ферментный комплекс

Заготовку переносят с E1 на E3. Молекулярная масса – порядка 6,5 млн. Д. Преобладает рибосома. Ключевым ферментом является E2. Каждая из субъединиц имеет по две липоевых кислоты. Молекулярная масса 1 субъединицы – 200 кДа.

Тиаминпирофосфат – производное B1. B1 состоит из двух колец, связанных CH_2 мостиком. Одно кольцо – азотистое основание.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ



“ иаминпирофосфат

Рис 10.7 Строение тиаминпирофосфата

Второе кольцо содержит серу. У тиамина есть пирофосфатная связь с ферментом через фосфатные группы. Он является кофактором. Он обладает аномально подвижным водородом за счет резонансных стабилизаций.

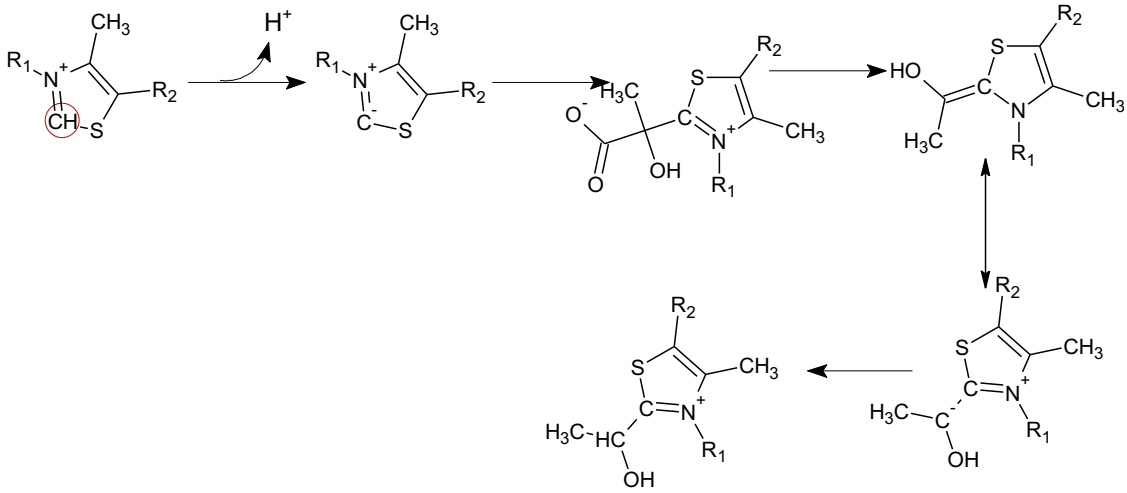
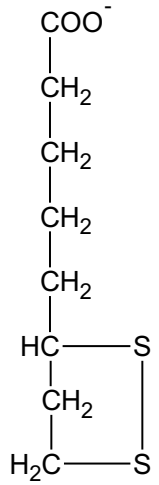


Рис 10.8 Образование гидроксиметильной производной тиаминпирофосфата

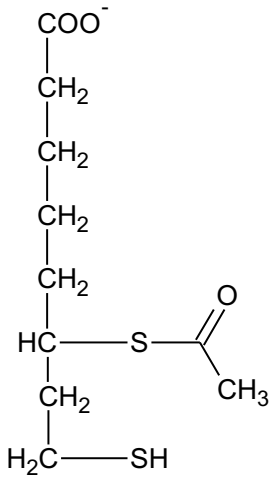
В первую очередь происходит потеря протона, С – крепкий нуклеофил, ищет + и находит его на карбонильном углероде. Происходит декарбоксилирование. Наличие резонансных форм стабилизирует состояние, в результате и активная частица и продукт реакции стабилизированы. На последнем этапе происходит протонирование и образуется гидроксиметильная производная.

Липоевая кислота – кислота с 8-ю углеродами, содержащая между 6 и 8 две тиольных группы, соединенных во внутренне-дисульфидный мостик.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ



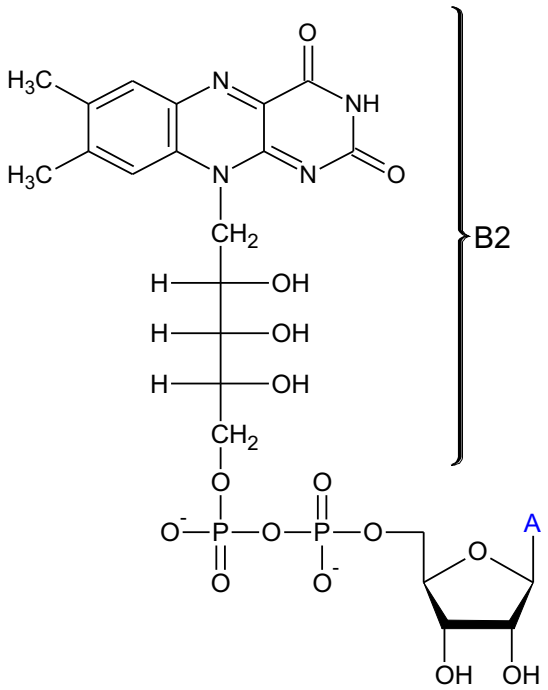
Ъипоева€ кислота



S-ацетил дигидролипоева€ кислота

Рис 10.9 Липоевая кислота и ее производная

В пируватдегидрогеназном комплексе липоевая кислота может быть в двух видах. Второй вариант - это S-ацетил дигидролипоевая кислота.



FAD

Рис 10.10 Строение FD

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Здесь первый раз получается не рибоза, а рибит. Рибофлавин занимает верхнюю часть схемы. Активная часть – это FAS или $FADH_2$ (восстановленная форма). FAD как и NAD – участник дегидрогеназных реакций, когда с органического субстрата забираются 2 атома водорода.

FAD – кофактор, NAD – кофермент. FAD прочно связан с белковой глобулой. NAD забирает гидрид-анион и выбрасывает протон в среду. FAD забирает оба протона и оба электрона. FAD и $FADH_2$ не заряжены. За счет разных потенциалов у них разная специфика: FAD в основном специализируется на изъятии водорода и образовании двойной связи.

Лекция 11

Цикл трикарбоновых кислот

Повторение материала:

Пируватдегидрогеназа состоит из трёх разных типов ферментов (E1, E2, E3). Это молекулярный конвейер, в который поступает пируват, а выходит ацетилкофермент А. Отсутствуют диффузионные стадии. Цикл осуществляется благодаря липоевой кислоте. Липоевая кислота – «кронштейн», что достигается благодаря поворотной ножке. Она амидной связью зацепляется за ε-аминогруппу лизина. Для функционирования пируватдегидрогеназного комплекса нужно 5 коферментов кофакторов.

Механизм:

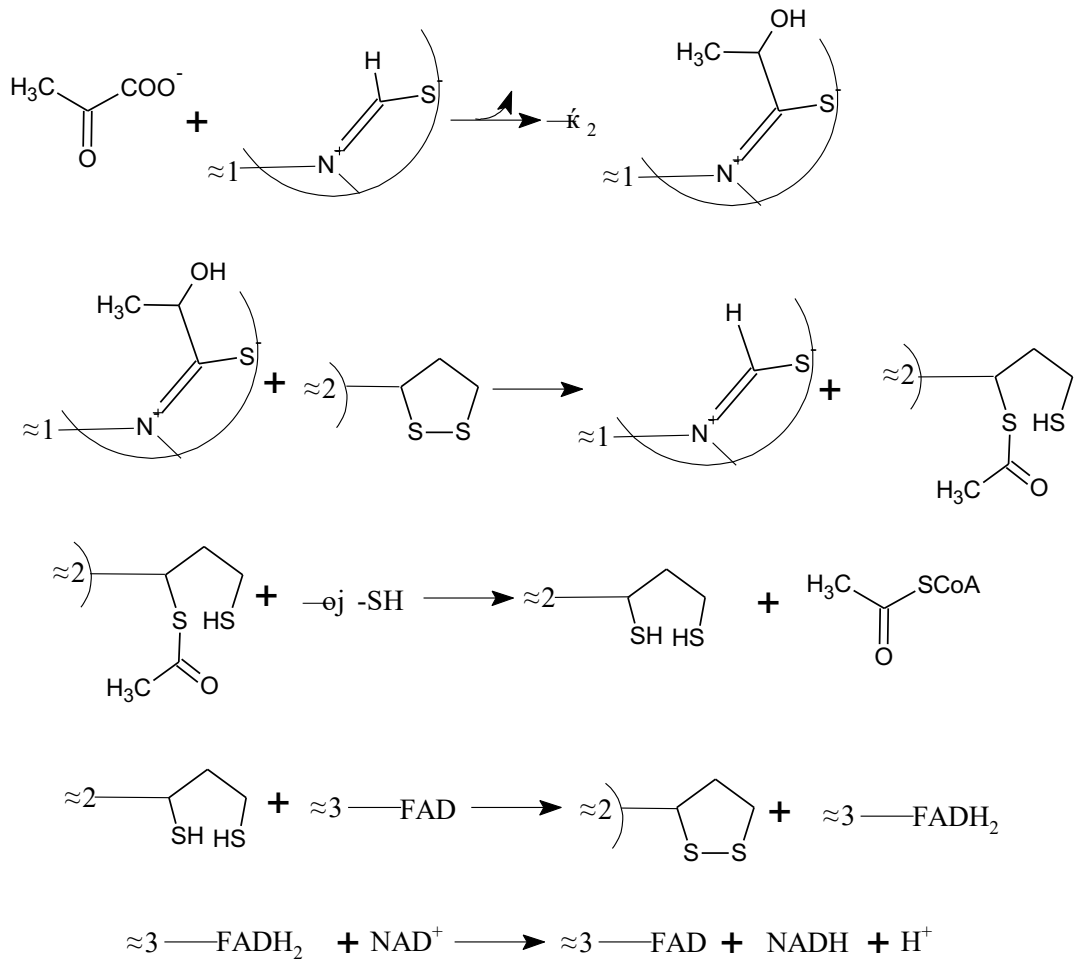


Рис 11.1 Схема образования ацилкофермента А

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Пируват встречается с E1. Тиаминпирофосфат участвует в декарбоксилировании. Получается промежуточная производная, улетает карбоксильная группа. Продуктом является гидроксиметильная производная. Подходит липоевая кислота, далее подходит E2, из которого торчит голова липоевой кислоты. В этот момент происходит окислительно-восстановительная реакция. E1восстанавливается в исходном виде, и он готов принимать следующую молекулу пирувата, E2 переходит в форму S-ацетил дигидролипоевой кислоты. С одной стороны, карбонильная группа окислилась до карбоксильной, а с другой стороны восстановился 1 S-S мостик до 2 SH групп. На ферменте E2 есть место для посадки кофермента А. Происходит тиолиз по карбонильному углероду. В результате E2 остаётся в восстановленном виде и не может дальше работать. Две последующие стадии нужны, чтобы вернуть липоевую кислоту в нормальную форму.

И NAD и FAD катализируют дегидрогеназные реакции, однако, есть структурные отличия. В случае NAD – присутствие двух остатков рибозы, в случае FAD – со стороны аденина имеется остаток рибозы, а со стороны флавинового кольца – восстановленная рибоза. FAD снимает два водорода с органического субстрата. Если NAD^+ забирает гидрид анион, превращаясь в NADH, и 1 протон выбрасывается в среду, то FAD принимает два атома водорода. Если NAD специализируется по переходам между гидроксильной карбонильной и карбонильной карбоксильной группами, то FAD специализируется на создании двойной S-S связи. FAD ковалентно связан с белковой глобулой и находится в каталитическом участке.

E2 переходит в активное состояние, но фермент E3 переходит в неактивное состояние.

Цикл трикарбоновых кислот

Из пирувата получается ацетилкофермент А. На этой стадии улетает CO_2. Ацетилкофермент А получается при участии NAD^+. Катализируют пируватдегидрогеназный комплекс три каталитических фермента и два регуляторных. Два регуляторных – киназа и фосфатаза.

Далее ацетилкофермент А встречается с 4-х углеродной дикарбоновой кислотой. Это оксалилуксусная кислота. OA – оксалоацетат. Эти два соединения объединяются. Уходит кофермент А, получается симметричная молекула цитрата. Это трехосновная карбоновая кислота. Эта стадия является главной и необратимой стадией цикла трикарбоновых кислот. ΔG стандартная биохимическая – 7 ккал/моль.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

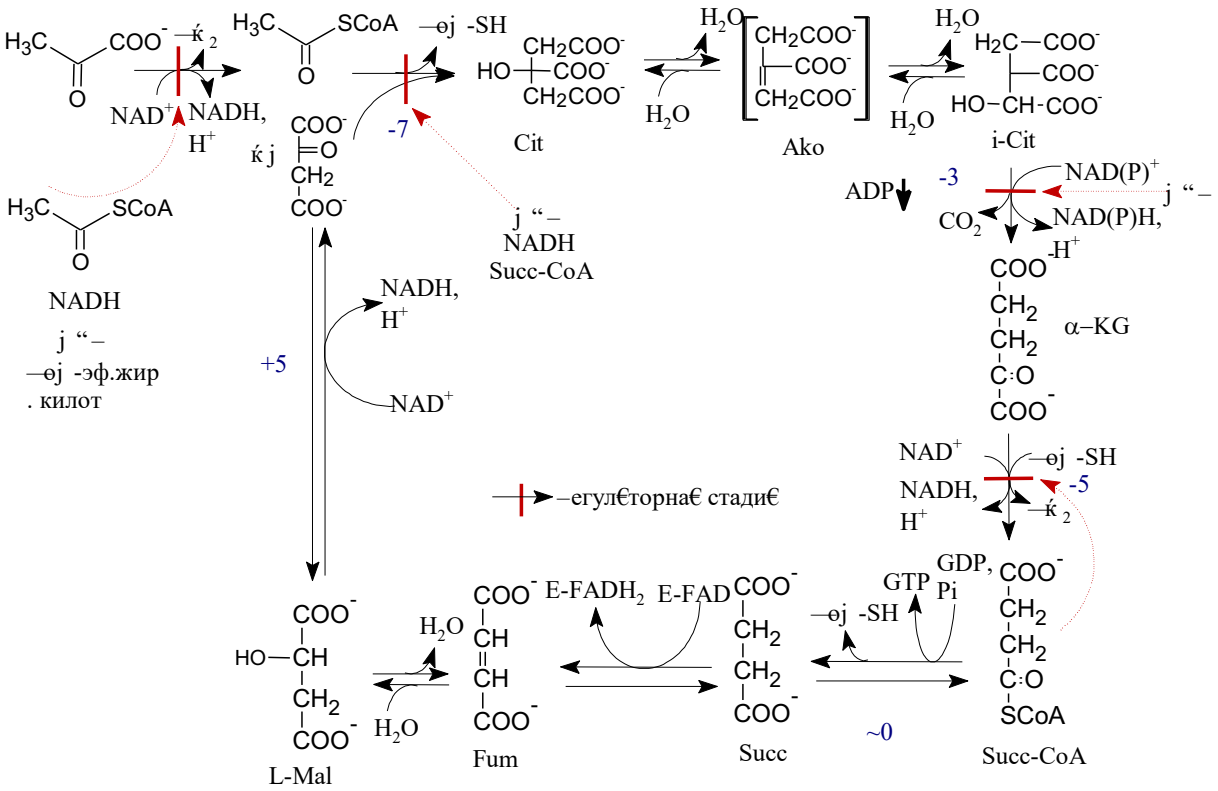


Рис 11.2 Цикл трикарбоновых кислот

Фермент, катализирующий эту реакцию, это *цитратсинтаза*. (Синтетаза с АТФ, а синтаза без АТФ). Далее идет обратимая реакция, уходит вода, образуется соединение. Это анион цисаконитовой кислоты. Фермент для этой реакции – **аконитаза.** В норме соединение не покидает активного центра, после дегидратации сразу идет гидратация. Реакция обратима. ΔG суммарно двух стадий слабо положительная. В результате образуется ещё одна трехосновная карбоновая кислота. Далее следует этап окислительного декарбоксилирования, улетает карбоксильная группа. Реакция необратима. Далее либо NAD^+, либо $NADP^+$ превращается в NAD(P)H и H^+. Фермент – *изоцитратдегидрогеназа*. Изоцитрат приходит с разных участков клетки, бывают разные изоформы. В результате остается пяти углеродная дикарбоновая α-кета кислота. Она называется α-Кетоглутарат (α – KG).

Этот цикл называется циклом Кребса (или циклом лимонной кислоты).

Далее улетает еще одна CO_2 группа и уходит кофермент А, NAD^+ превращается в NADH, H^+. Получается сукцинилкофермент А. Все происходит так же как в пируватдегидрогеназном комплексе, отличия только в регуляции. В качестве дополнительного вещества кофермента требуется ион марганца. Марганец в переходном состоянии создает мостики.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Получается α-кетоглутаматдегидрогеназный комплекс. Затем идёт обратимая реакция, уходит кофермент А, остается сукцинат (Succ). Цикл закручен, нельзя терять энергию, поэтому GDP, Pi превращается в GTP. Центр связывания на ферменте специфичен к G. Название фермента сукцинил-КоА-синтетаза. Равновесие здесь близко к нулю. Если нужно создать карбонильную группу, проще всего создать её из гидроксильной.

Далее приходит фермент и забирает два водорода. Образуется фумаровая кислота. ΔG близка к нулю. На следующей стадии идёт гидратация. Фермент – *фумараза*. Он работает только с трансизомером. В обратную сторону фермент работает только с l изомером образующегося соединения. С D изомером не работает.

L – малат, анион яблочной кислоты.

NAD^+ идёт до NADH, H+. Фермент – малат дегидрогеназа. ΔG равна +5.

Суммарный запас – не запасаемая энергия, тратится на необратимость цикла. Вылетело 3 молекулы CO_2. Один из результатов цикла – полная потеря всех шести атомов углерода.

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

Главная задача цикла трикарбоновых кислот – аккумулировать всю энергию в виде восстановленных форм коферментов кофакторов. При переносе ацетила на оксалоацетат теряется CO_2.

Локализация в клетке

Процесс гликолиза идет в цитозоле, и все ферменты расположены там же. Внешняя митохондриальная мембрана имеет много крупных пор, сквозь нее проходит много молекул. Внутренняя мембрана представлена выростами и плохо проницаема. Это необходимо для разветвленной поверхности. Митохондрия часто называется *энергетической станцией*. Внутримембранная часть – тоже вода – называется *матрикс*, там находится пируватдегидрогеназный комплекс. Пируват переносится через внутреннюю мембрану, через специальную транспортную систему. Все ферменты цикла Кребса (кроме сукцинат дегидрогеназы, аконитазы) находятся в матриксе. Эти два фермента находятся во внутренней мембране. Во внутренней мембране находятся переносчики электронно-транспортной цепи. Там же присутствует АТФ-синтетаза. Только оксалоацетат не перемещается из внутренней мембраны во внешнюю и наоборот, т.к. для него нет транспортной цепи.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Регуляция

Есть несколько регуляторных стадий. Продукт является блоком в α-кетоглутаратдегидрогеназном комплексе.

В пируватдегидрогеназном комплексе блоком являются непосредственный продукт, NADH, АТФ и ацилкоферменты А. Все ингибиторы высокоэнергетические. Все механизмы примерно одинаковы по обратной связи. Регуляция на уровне $NADP^+$ только при участии активатора АДФ. Эффекторы делятся на активаторы и ингибиторы, блоком является АТФ. Остальные стадии являются нерегуляторными.

Концентрация оксалоацетата – еще один важный регуляторный фактор. Если его мало, то не будет возможности переработать много ацетилкофермента А. Если мало оксалоацетата, то обедняется пул промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот.

Цикл трикарбоновых кислот – универсальный приемо-раздаточный механизм. Принимает ацетильные хвосты не только от глюкозы. Надо провести реакцию карбоксилирования, чтобы пополнить пул промежуточных веществ.

Лекция 12

Точки входа в цикле трикарбоновых кислот

Очень важной характеристикой является оксалоацетат. Молекулы пирувата и молекулы оксалоацетата очень похожи.

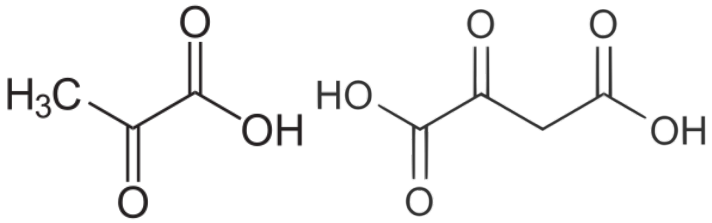


Рис 12.1 Пируват и оксалоацетат соответственно

Ацетилкофермент А является ингибитором пируватдегидрогеназного комплекса, есть механизм непосредственной обратной связи.

Анаплеротические реакции – пируват карбоксилазные реакции – пополняющие пул промежуточные продукты. Некоторые из них используются только для этих целей.

1) пируват + HCO_3^- + АТФ → оксалоацетат + АДФ + Pi

Фермент, катализирующий эту реакцию – *пируват карбоксилаза*. Реакция протекает преимущественно в печени или почках. В скелетных мышцах и сердце преобладает другая анаплеротическая реакция:

2) CH_2=C(OP)-COO^- + CO_2 + GDP → оксалоацетат + GTP

Принципиальное различие этих двух реакций заключается в том, что пируват – низкоэнергетическое соединение, а второе – сверхвысокоэнергетическое соединение, в нем энергии в 2 раза больше, чем в двух макроэргических связях. В первом случае тратится энергия в виде АТФ для запуска процесса, а во втором случае энергии хватает, чтобы зафиксировать CO_2 и сделать оксалоацетат, и еще остается на макроэргическую связь. Поэтому во втором случае используется GDP. В первом случае происходит трата энергии, во втором случае еще и запасание. Во втором случае глюкоза, превратившаяся в фосфоенолпируват, проходит с нулевым гликолитическим выходом, т.к. утратился фосфоенолпируват.

Фермент, катализирующий эту реакцию, *фосфоенолпируваткарбоксикиназа*. Вторая реакция – *фосфорилирование* субстрата за счет фосфатной группы высокоэнергетического соединения. Чаще всего используется АТФ, но может использоваться любое соединение, способное отдать фосфатную группу.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Это две главные анаплеротические реакции, идущие в организмах.

3) Фосфоенолпируват + HCO_3^- → оксалоацетат + Pi

Фермент – *фосфоенолпируваткарбоксилаза*. Эта реакция протекает в растениях в фотосинтезирующих частях.

Смысл этой реакции в подавляющем большинстве случаев – не пополнить пул оксалоацетатом, а поймать CO_2 и отправить в фотосинтез. В тех местах планеты, где очень жаркий климат, площадь поверхности зеленых листьев обедняется CO_2 и обогащается кислородом. Фермент, катализирующий эту реакцию, – *рубиско* – обладает не высоким сродством к CO_2 и хорошим сродством к кислороду. Образуется нехватка CO_2 для фотосинтеза. Фосфоенолпируват карбоксилаза обладает высоким сродством к CO_2, и это CO_2 в цикле переходит дальше на рубиско.

4) Пируват + HCO_3^- + NADH → малат + NAD^++H^+

Присутствует во многих тканях. Фермент, катализирующий эту реакцию, – *малат-фермент*. Возможно в случае, если АТФ мало, но есть NADH. Это важная реакция, поскольку энергия внезапно может потребоваться в больших количествах.

Глиоксалатный цикл

Условно анаплеротическим можно назвать циклический процесс, протекающий в растениях – глиоксалатный цикл.

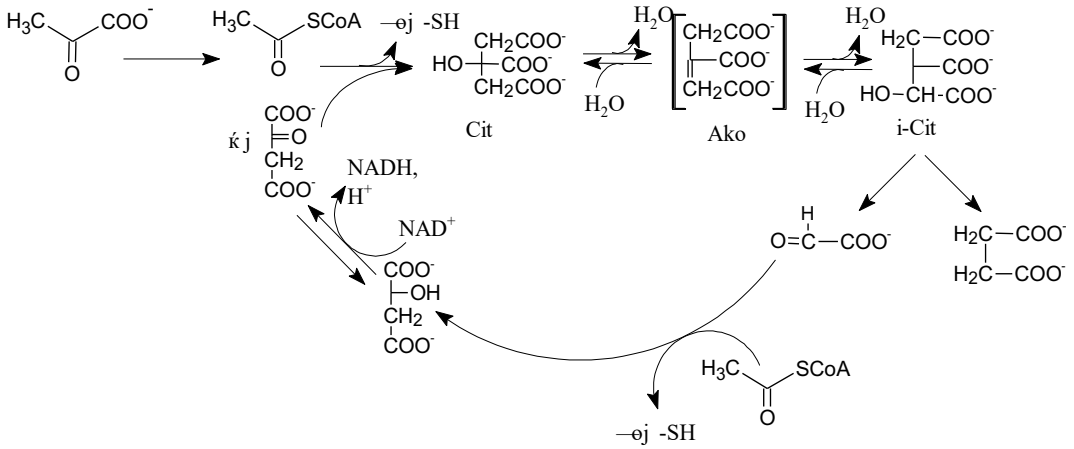


Рис 12.2 Глиоксалатный цикл

Пируват превращается в ацетил кофермент А и встречается с оксалоацетатом. Цитратсинтаза производит цитрат, аконитаза превращает его в изоцитрат.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Затем вместо потери двуокиси углерода, данная молекула расщепляется и под действием фермента *изоцетратлиаза* четырехуглеродный фрагмент в виде сукцината удаляется, и остается соединение с 1 карбонильной и 1 карбоксильной группой. Это соединение называется **глиоксалат**. В реакцию вступает вторая молекула ацетилкофермента А, происходит еще одна конденсация, и получается малат. Уходит кофермент А под действием фермента *малат-синтаза*. Дальше под действием малатдегидрогеназы NAD^+восстанавливается до NADH. Этот цикл протекает исключительно у растений, наиболее активно – в момент проращивания семян.

Данный цикл протекает наряду с циклом трикарбоновых кислот. Сущность цикла Кребса в том, что он ведет к CO_2 и H_2O и необходим для образования энергии. А в данном цикле выделяется молекула сукцината. Данный цикл производит четырехуглеродное соединение и является запасным путем построения организма, когда невозможен фотосинтез. Глиоксалатный цикл протекает в специализированных органеллах – глиоксисомах.

Сукцинат отправляется в цикл трикарбоновых кислот в митохондриях, а на «стройку» отправляется малат. В растениях идет процесс, который более специфичен для животных организмов – *глюконеогенез*, когда нет возможности использовать фотосинтез.

Первичный метаболизм протекает с небольшими изменениями у всех организмов на земле, это крупнотоннажный процесс, важный с точки зрения жизнедеятельности.

Вторичный метаболизм важен с точки зрения видов или группы видов.

Синтез витамина С из глюкозы также является важным процессом. Протекает в растительных организмах, но и животные организмы тоже должны получать витамин С.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

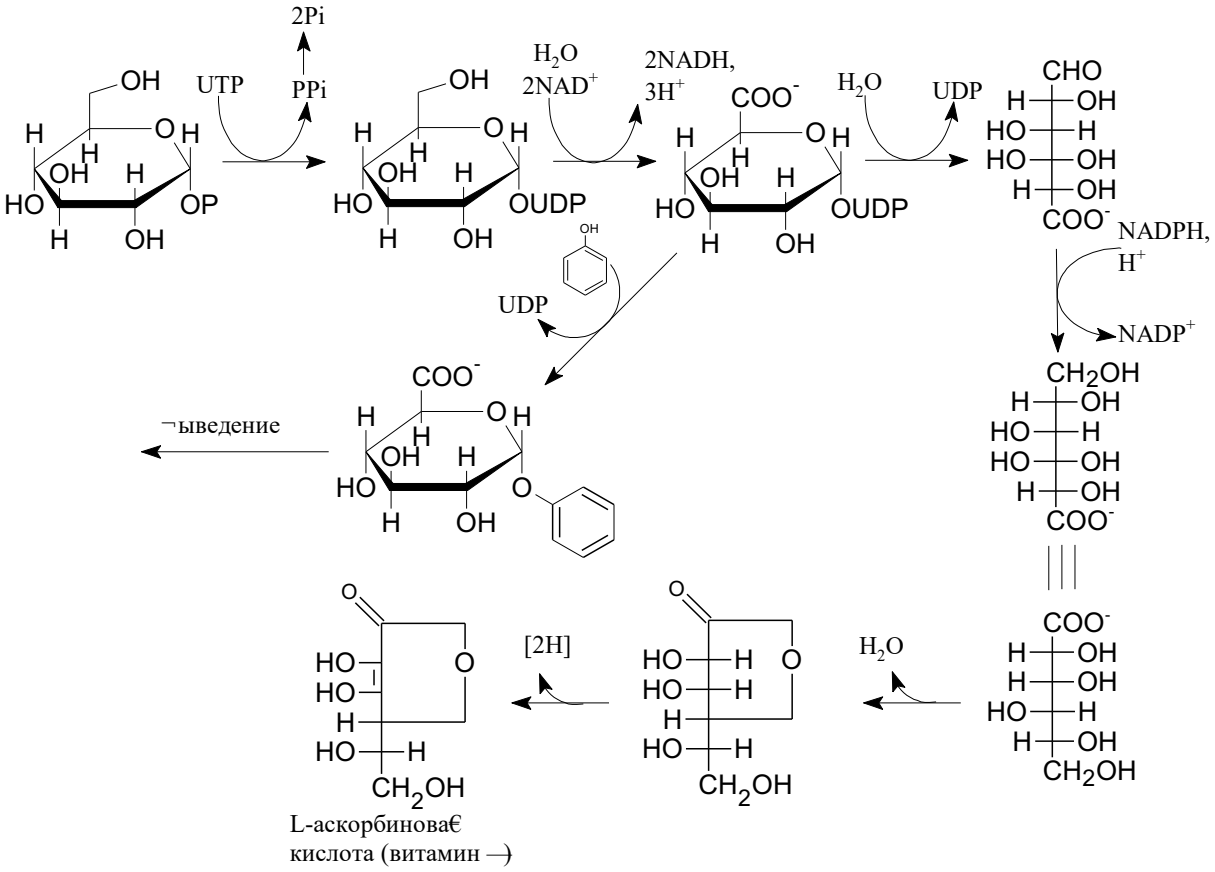


Рис 12.3 Синтез витамина С

Если что-то синтезируется из глюкозы, не обязательно начинать цепочку с глюкозы, можно использовать ее производные.

Глюкозо-1-фосфат получается из крахмала или в результате гликогенолиза (в случае с животными организмами). Не нужно переносить маленькую молекулу на большую, задача заякорить первую группу. Из-за УТФ улетает PPi. Пирофосфат будет разложен до двух фосфатов. Процесс необратим. В результате получается УДП глюкоза. Витамин С – это аскорбиновая кислота. Нужно провести четырехэлектронное окисление. Далее заходят две молекулы NAD^+ и молекула H_2O, получается две NADH и три H^+. Получается соединение, у которого в 6-ом положении присутствует карбоксильная группа. Эта кислота называется *глюкуроновой*. Это один из центральных метаболитов. Ведет не только к витамину С, но участвует в детоксикации организма. Например, в случае фенола, уходит УДП, получается глюкуронат. В таком виде фенол выводится из организма. Другие фенольные соединения также могут выводиться с производной глюкуроновой кислотой. Далее идёт гидролиз и уходит УДП. В первом положении образуется карбонильная группа. Нужно получить L-производную и далее получить кислоту.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Для этого используется NADPH до $NADP^+$, и происходит восстановление альдегидной группы**.** Окисляется 6-е положение, восстанавливается первое. Получается L-гулоновая кислота. Дальше следует лактанизация – отщепляется вода и под действием лактаназы получается l-гулонолактон. Требуется двойная связь, реакция катализируется соответствующей оксидазы. Получается лактон L-аскорбиновой кислоты.

Витамин С – это коллаген, препятствующий возникновению болезни цинга. Цинга проявляется в хрупкости костей и кожи. В коллагене помимо пролина есть 4-гидроксипролин. Коллаген существует в виде суперспирали. Эти суперспирали двигаются относительно друг друга. Поперечные сшивки скрепляют спирали. Поперечные водородные связи – один из вариантов скрепления.

Оксигеназы делятся на два типа: *монооксигеназы* и *диоксигеназы*. Монооксигеназы включают один атом кислорода в органический субстрат, а другой превращают в воду.

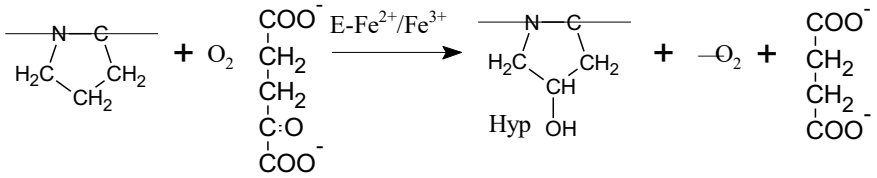


Рис 12.4 Диоксигеназная реакция

Это диоксигеназная реакция, но атомы кислорода расходятся по разным субстратам. Один входит в четвёртое положение пролина и получается 4-гидроксипролин (Hyp), неканоническая очень важная аминокислота. Далее улетает CO_2, идет окислительное декарбоксилирование. Получается сукцинат. Катализирует процесс фермент *пролиноксидаза*. Нужно восстановить атом железа. Приходит аскорбиновая кислота, она превращает железо 3^+ в железо 2^+. Такие окислительные процессы очень распространены. В результате взаимодействия с железом получается окисленная производная аскорбиновой кислоты с тремя карбонильными группами.

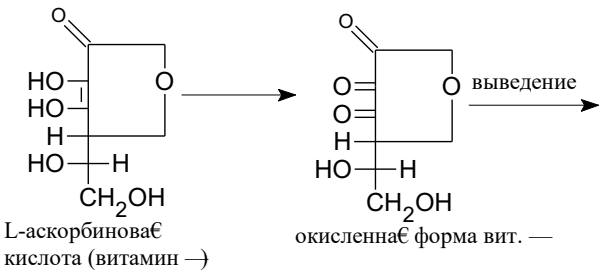


Рис 12.5 Схема выведения витамина С

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Витамины (B1, B2 и т.д.) превращаются в коферменты или кофакторы и либо являются каталитическими наконечниками и возвращаются в исходное состояние, либо циклически видоизменяются и перемещаются. Витамин С не регенерируется, а выводится из организма. Содержится не только в цитрусовых, но и в зелени.

Если идёт декарбоксилирование, в качестве кофермента почти всегда выступает тиаминпирофосфат. Для карбоксилирования в качестве фермента выступает **биотин** (витамин Н)

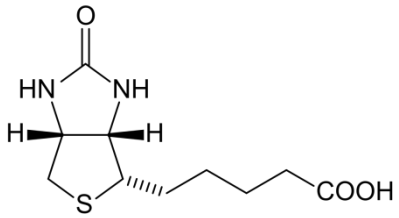


Рис 12.6 Формула биотина

Биотин является кофактором карбоксилазы и крепится к ней к лизину через амидную связь. Схож с липоевой кислотой из-за наличия длиной гибкой ножки. Чтобы биотин смог присоединить CO_2, нужно потратить молекулу АТФ.

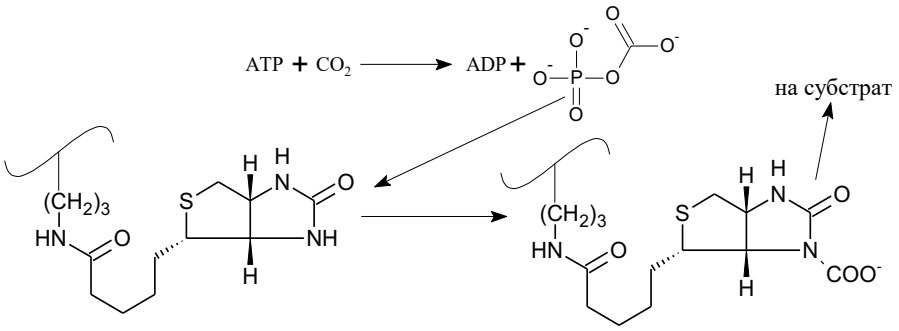


Рис 12.7 Активация биотином CO_2

В таком виде двуокись углерода передается на биотин, далее на субстрат. Биотин нашел применение в иммунно-химическом анализе, он создает комплекс с авидином, который обладает константой связывания больше 10^{10}.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 13

Пентофосфотазный (пентозофосфатный) путь гликолиза

Повторение материала предыдущих лекций:

Глюкоза – важный метаболит. **Гликолиз** – многотоннажный процесс, протекающий у самых разных организмов – от человека до дрожжей и бактерий.

Несмотря на всё разнообразие пищи, набор продуктов ограничен: углеводы, жиры и аминокислоты используются как основные источники строительства и энергии. Из моносахаридов глюкоза является самым распространенным, нужно уметь получать из неё различные важные соединения.

Вариант полуторного метаболизма, между первичным и вторичным метаболизмом – это **пентофосфотазный (пентозофосфатный)** путь. Это путь, состоящий из нескольких процессов, которые связываются лишь условно, так как могут существовать один без другого. Их объединение необязательно. В нем присутствуют окислительные и неокислительные этапы. Если сбалансированы потребности клетки в двух продуктах в энергетическом эквиваленте NADPH и в пентозе или рибозо-5-фосфате, то все ограничивается одним этапом – окислительным. NADPH важен для биосинтеза жирных кислот. Организму для построения ДНК, РНК нужно много рибозы. Окислительный этап позволяет получить оба фрагмента.

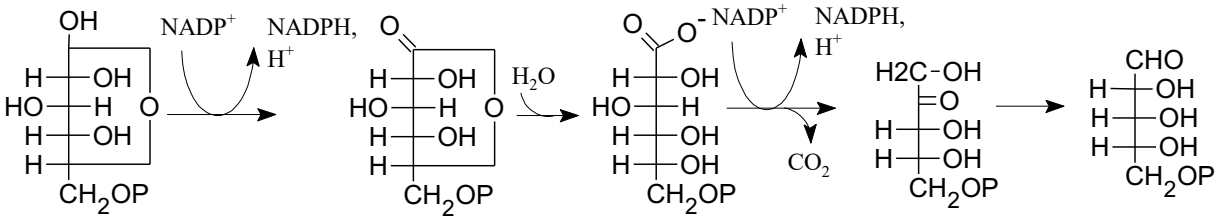


Рис 13.1 Пентофосфотазный путь

Глюкоза-6-фосфат, дегидрогеназа $NADP^+$ восстанавливается до NADPH. Из этого следует, что сахар окисляется. Он может окислиться только в 1 положении, следовательно, в дело вступает лактон, далее следует гидролизация и получается *фосфоглюконовая кислота.* Далее снова идёт дегидрогеназная реакция**,** улетает CO_2, соответственно, производится еще один эквивалент NADPH. Далее этап окислительного декарбоксилирования. В большинстве случаев окислению подвергается соседний от улетевшего CO_2 углерод. Образуется рибоза-6-фосфат. Фермент – *изомераза*, следовательно, должна быть изомеризация. Происходит окисление, а следом идёт нужная изомеризация.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Есть только окислительный этап, когда потребности клетки в NADPH и в рибозе сбалансированы. Обновляются нуклеиновые кислоты и синтезируются жирные кислоты. Бывают либо специфические клетки, либо специфический этап развития клеток, когда у них есть потребность в одном продукте. Рассмотрели подобный вариант, когда жировой клетке надо массу NADPH, чтобы делать запасы, а ДНК строить не надо. Возникает избыток рибозо-5-фосфат, который нужно утилизировать. Специального метаболического пути для рибозы нет, надо вернуть её в глюкозу и по необходимости отправить в гликолиз или в гликоген.

NADH и NADPH появились для того, чтобы создавать независимую регуляцию для одних и тех же ферментов. Разнонаправленные процессы идут практически в любой части клетки. Катаболические процессы преимущественно идут в матриксе, а анаболические – преимущественно в цитозоле. Для производства NADH нужно, чтобы в матриксе было много NAD^+, а в цитозоле – много восстанавливающих эквивалентов. $C_{NAD^+}/C_{NADH} > 1$ (матричная)

$$C_{NADP^+}/C_{NADPH} < 1 \text{ (цитозоль)}$$

NADH и NADPH через внутреннюю митохондриальную мембрану просто так не переносятся. Это сложная задача, которая реализуется при помощи одного из двух челночных механизмов. В связи с этим есть серьезная потребность в окислительном этапе.

Пентофосфотазный путь

Рассматриваем случай с избытком рибозы, которую нужно вернуть в глюкозу. Задействованы пять реакций и четыре фермента. Первый фермент – это *рибозо-5-фосфат*.

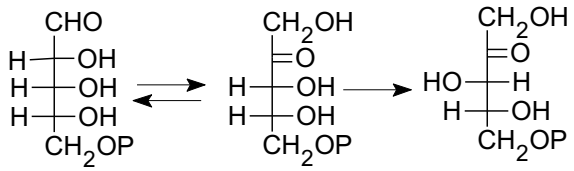


Рис 13.2 Получение ксилулозы-5-фосфата

В результате получается ксилоза или ксилулоза-5-фосфат. Второй фермент – *фосфопентоизомераза*. Третий и четвертый ферменты – *трансальдолаза и транскетолаза*. Нужна пара кетоза-альдоза. Оба забирают фрагмент с кетозы и переносят его на альдозу. Транскетолаза забирает C_2 фрагмент, в результате то, что было кетозой становится альдозой, а то, что было альдозой становится кетозой. Альдозала снимает C_3 фрагмент. Это ретроальдольные конденсации. Транскетолаза

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

использует в качестве кофактора тиаминпирофосфат. Трансальдолаза не требует кофакторов кроме кальция.

Здесь реализуется механизм *пинг-понг*: реакция фермента со вторым субстратом происходит лишь после образования одного из продуктов ферментативного превращения.

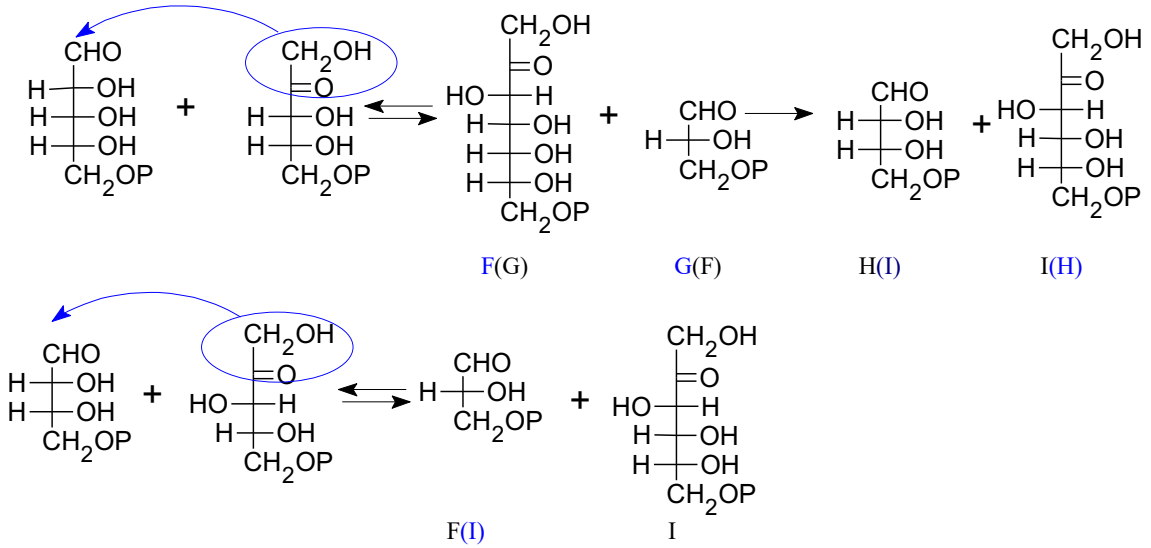


Рис 13.3 Ретроальдольная конденсация

С ксилулозы забираем C_2 фрагмент и переносим его на альдегид. В качестве фермента на первой стадии выступает транскетолаза

Продукт называется седогептулозо-7-фосфат. Далее приходит фермент D, который забирает с кетозы трехуглеродный фрагмент и переносит его на альдозу. Продуктом является эритроза 4 фосфат. Существует одна альдегидная триоза и две альдегидных тетрозы. Предшественник рибозы – эритроза.

Важно: сахар с тремя атомами углерода – **триоза**, а с четырьмя - **треоза**.

Продуктом здесь является фруктозо-6-фосфат. Далее еще один эквивалент вещества E реагирует с H. Нам нужен альдегид, и это эритроза. H – эритроза, I – фруктоза. Переносим C_2 с кетозы на альдозу и получается глицеральдегид фосфат F.

На входе имеем одну рибозу и ксилулозу. 6 пентоз превращаются в 5 гексоз.

Может быть делящаяся клетка, которой не нужно аномально высокого содержания жирных кислот, ей надо строить много молекул ДНК. Есть необходимость в большом количестве рибозы, возникает дисбаланс. Организм решает эту задачу посредством **альтернативного пути**. Процесс, альтернативный пентофосфотазному

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

пути. Когда организму нужна рибоза фосфат, берут 4 эквивалента фруктозофосфата, два эквивалента глицеральдегидфосфата и прогоняют через реакции неокислительного этапа в обратную сторону.

Полный путь до воды и углекислого газа

Если обратить внимание на характеристику биохимического дыхания, то на первом этапе протекает гликолиз, потом цикл Кребса. На этой стадии нет ни воды, ни энергии. Водороды, которые войдут в состав воды, в восстановленной форме коферментов и кофакторов из полученных стадий. Кислород поступает из воздуха.

Используется некоторое количество NADH, 2 эквивалента $FADH_2$ и ГТФ, и в гликолизе два эквивалента АТФ. Основная энергия содержится в виде NADH и $FADH_2$. Третий этап – электронно-транспортная цепь. Идут два сопряженных процесса – цепь и окислительное фосфорилирование. Далее получение АТФ из АДФ и фосфата.

Синтез АТФ без электронно-транспортной цепи невозможен.

От соединений богатых энергий идут окислительно-восстановительные реакции. Электрон передается, вещество окисляется. Вещества, получившие электрон, восстанавливается. И так далее.

Основные окислительно-восстановительные этапы

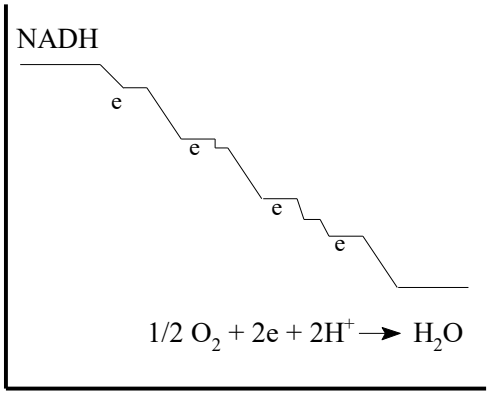


Рис 13.4 Электронно-транспортная схема

Все начинается с NADH. В дело вступает фермент NADH дегидрогеназа. Он содержит простетические группы двух типов. 1 тип – *флавинмононуклеотид*. Дальше некоторое количество железно серных кластеров. Заканчивается *убихиноном*.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

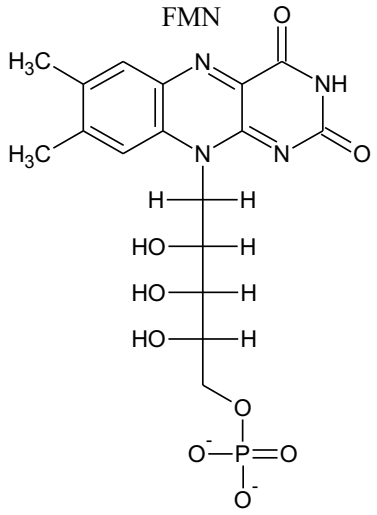


Рис 13.5 Флавиномононуклеотид

Флавинмононуклеотид – производная рибофлавина(FMN).

Флавинмононуклеотид на самом деле не является нуклеотидом, это историческое название. Железно-серные кластеры – это некое количество атомов железа и серы, объединенных в кластеры. Какая-то часть атомов серы происходит от цистеинов, а какая-то часть – это неорганическая сера. Из 3^+ железо переходит в 2^+, потом в 3^+. Существует проблема с валентностями. Переносчиками выступают ФММ, железно-серные кластеры и убихинон.

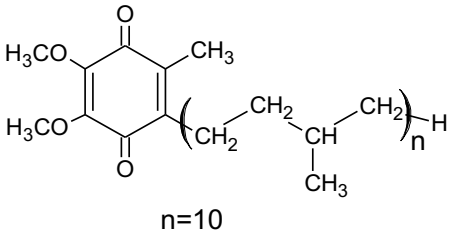


Рис 13.6 Убихинон

Убихинон – наиболее окисленная форма. Состоит из рабочей головы – хинона – и жирного изопреноидного хвоста – повторяющегося пятиуглеродного фрагмента.

Изопреноиды – каучук, гуттаперча, все стероиды, витамин А и провитамин А. n=10 чаще всего. Убихинон участвует в ОВР и существует в двух форма - в форме *семихинона и убихинола.*

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

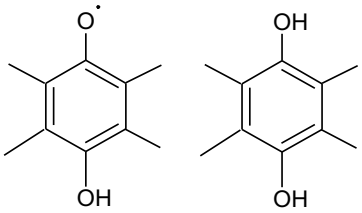


Рис 13.7 Семихинон и убихинон

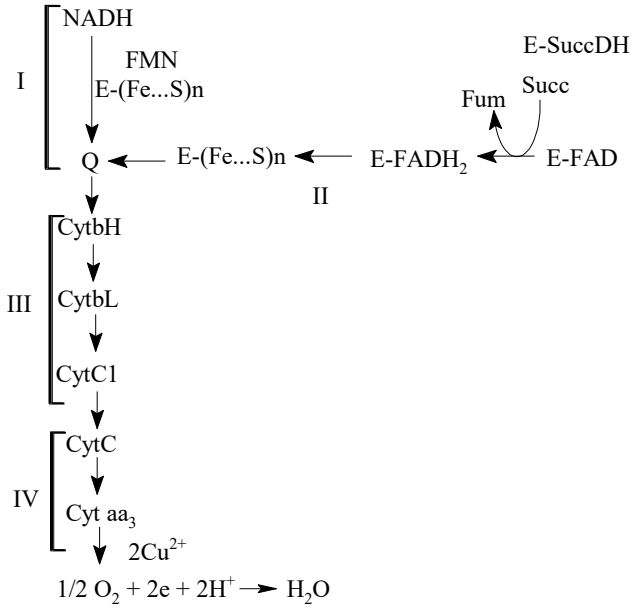


Рис 13.8 Схема биохимического дыхания

Комплекс 1. Синтезируется 1 эквивалент АТФ.

Комплекс 2. E-FAD сукцинатдегидрогеназа превращается в E-$FADH_2$. Через железно-серные кластеры попадает на убихинон. Е-сукцинатдегидрогеназа.

Комплекс 3. Далее в дело вступают цитохромы b, bH, bL, затем C1 и C. От bH до C – располагается комплекс C. Цитохромы – четвертый тип переносчика. Это небольшие белки, которые имеют молекулярную массу 10 кДа и содержат гемовое железо, порфириновое кольцо и железо. Важно, что внутри находится железо, которое может быть окислено в восстановленной форме**.**

Цитохромы

Цитохромы делят на A, B, C, F. Классифицируются благодаря спектрам восстановленной формы.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

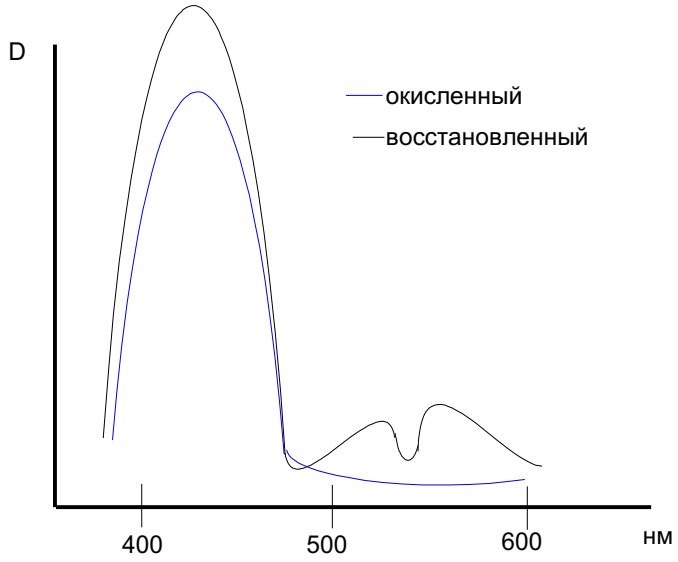


Рис 13.9 Спектр поглощения окисленной и восстановленной формы цитохрома

При 280 поглощает белковая часть. Выше 400 – полоса Соре. По ней можно мерять чистоту белка. Коэффициент экстинкции 3,15 в пользу полосы Соре. Белки не очень хорошо поглощаются. Если получается значение близкое к 3,15, это значит 1 гем на одну белковую часть. Если значение ниже, это показывает значительное количество молекул цитохрома без гема, и фермент неактивен. Препарат не чистый.

Дальше следует 4 комплекс, который называется цитохром aa_3 или цитохромоксидаза. Еще два атома меди Cu^{2+}. То есть в цитохром оксидазе есть субъединицы а и a_3, и есть два гема с железа и два атома меди. И электроны сначала попадают на гемовое железо, потом на медь, и медь является предшественник передачи на кислород. Ферменты, которые занимаются окислением кислорода воздуха, часто содержат атомы меди. Затем передача на кислород двух электронов и берутся два протона из среды. Все реакции протекают со снижением ΔG.

Cu^{2+} выступает переносчиком также в электронно-транспортной цепи.

Все, что находится в комплексе, геометрически правильно расположено относительно друг друга и не движется в мембране. Есть только два вещества, которые могут двигаться – убихинон и цитохром С. В четвертом комплексе ингибиторами цепи являются угарный газ, цианистый калий и H_2S из-за их высокого сродства к железу в геме. Блокируют электронно-транспортную цепь, что приводит к летальному исходу.

.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 14

Синтез АТФ

В результате цикла Кребса собирается значительное количество установленных форм коферментов кофакторов, затем они попадают в цепь окислительно-восстановительных реакций. Существует много переносчиков кроме белковых частей: железно-серные кластеры, хинон, цитохромы. Атомы меди в составе цитохрома являются предшественниками переноса электрона на кислород. Если переносчик находится плотно в мембране, то он входит в состав комплекса.

Исследователей всегда интересовал вопрос: за счет чего синтезируется АТФ?

Первая выдвинутая гипотеза: по электронно-транспортной цепи образуются сверхвысокоэнергетические соединения, которые поставляют энергию на синтез АТФ.

Вторая гипотеза: в электронно-транспортной цепи возникают высокоэнергетические конформации белков.

Гипотеза, которая в итоге стала теорией – **хемиосмотическая теория**.

Хемиосмотическая теория

По мере протекания окислительно-восстановительных реакций протоны выбрасываются из внутреннего пространства в цитозоль. Создается градиент и появляется разность потенциалов, т.н. трансмембранный потенциал, выброшенные протоны запасают энергию, стремясь во внутреннее пространство.

АДФ + фосфат = АТФ.

Мембрана должна быть целостной. Сама по себе мембрана непроницаема даже для протонов. Если ввести вещество, связывающее протоны (разобщающие агенты), образуется проход через мембрану.

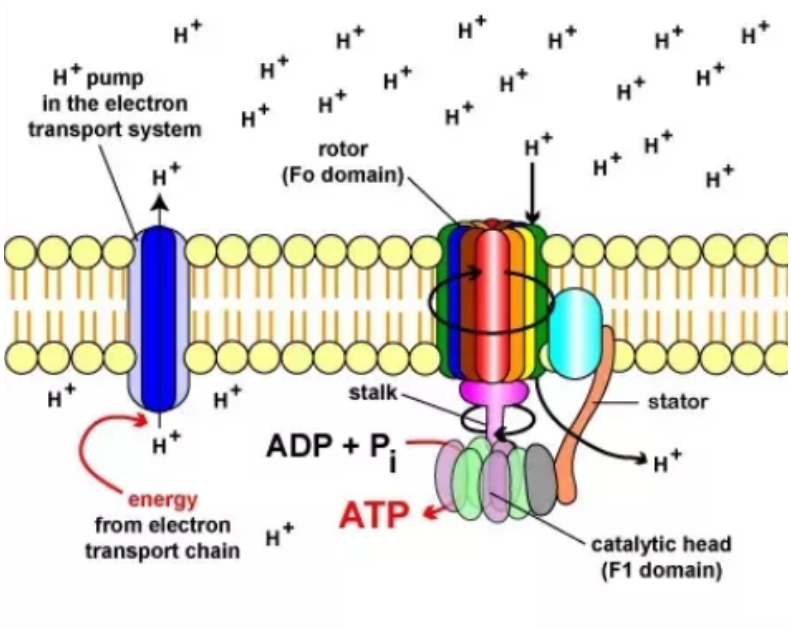


Рис 14.1 Ротор и статор

Электроны выбрасываются в результате электронно-транспортной цепи наружу, АТФ-синтетаза обращена в матрикс, АТФ-синтетаза состоит из массы субъединиц, но из двух больших частей F_0 и гидрофобных субъединиц. Протоны движутся внутрь ротора и поворачивают систему каждый раз на 120 градусов. Фрагмент F_1 состоит из трех α и трех β субъединиц чередующихся. Кривая ножка – γ субъединица и δ субъединица. В статоре тоже есть субъединица. α и β субъединица крутятся, а стационарная часть их искажает. Изменение ширины ворот субъединиц достигается за счет вертикальной искажающей палки.

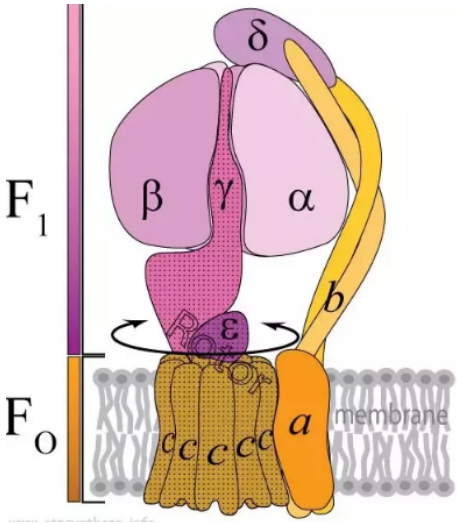


Рис 14.2 Вращение ротора

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Есть основание F_0, γ основание несимметрично, δ– некий фиксатор.

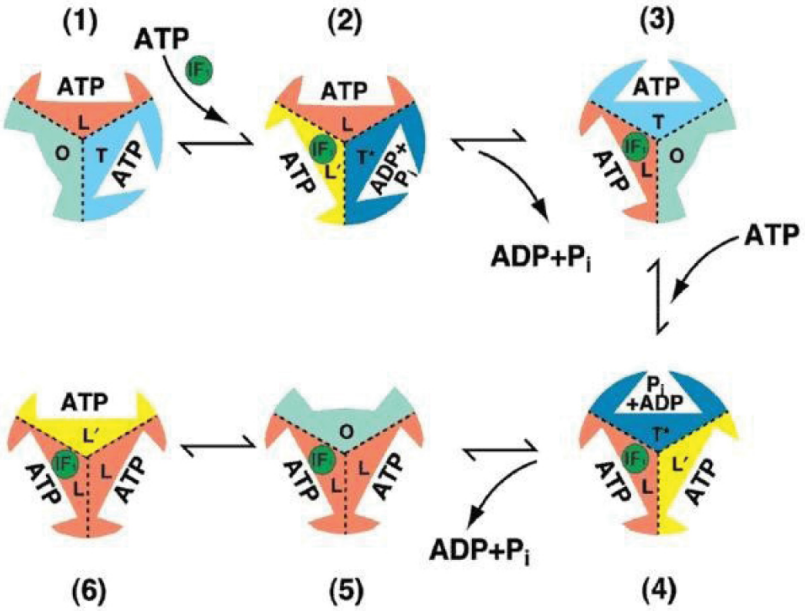


Рис 14.3 Механизм АТФ-синтазы

Механизм: α-субъединицы одинаковы и не меняются, β-субъединица может быть в трех вариантах. Она либо полностью открыта, либо полузакрыта, либо совсем закрыта в другой субъединице АДФ и фосфат закреплен, осуществляется поворот, АДФ переходит к более раскрытому состоянию и готово уходить, АДФ и фосфат сближаются в закрытые субъединицы.

$$АДФ^{4-} + H_2O = АДФ^{3-} + PO_4^{2-} + H^+$$

АДФ и фосфат одноименно заряжены, поэтому их нужно посадить на белок, чтобы они сблизились. После поворота – получается АТФ. Механизм «чеканки монеты».

Протоны вышли за счет цепи, обратно только через внутренний канал F_0 субъединицы, за счет этого осуществляется вращение, вращается не только ручка, но и голова. Голова – рабочий механизм три β и три α субъединицы и искривлена ножка, рядом находится фиксатор. Достигаются 3 конформации у β субъединицы, и за три протона высвобождается АТФ.

Каким образом протоны выкачиваются из матрикса в цитозоль?

1) Должно быть вещество, которое может обратимо связывать протон и отдавать.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

2) Это вещество должно связывать протоны со стороны матрикса, а отдавать со стороны цитозоли, т.е. оно должно мигрировать внутри мембраны

3) Это должен быть промежуточный этап электронно-транспортной цепи, чтобы хватало энергии, чтобы были сопряженные реакции

Убихинон имеет рабочую голову, что позволяет брать-отдавать протоны и длинный хвост, что позволяет ему двигаться внутри неполярного слоя мембраны.

Первое, где раскрыли, как работает убихинон – это стыковка комплекса номер 1 и номер 3 или 2 и 3.

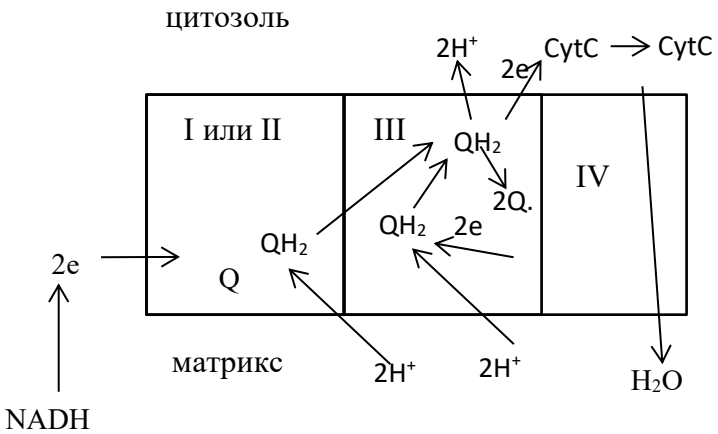


Рис 14.4 Движение протонов

Комплекс 2 не пронизывает всю мембрану, а 1 пронизывает. От H_2 до убихинона, либо от NADH до убихинона.

Два полуцикла крутятся, при этом они сходны в том, что протоны берутся из матрикса и выбрасываются в цитозоль. Это Q цикл.

Гликолиз протекает в цитозоли. Результат – 2 эквивалента АТФ на 1 глюкозу и NADH. NADH должен находиться в матриксе. $NADH_2$ не идет через мембрану. Используется челночный механизм для переноса NADH.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

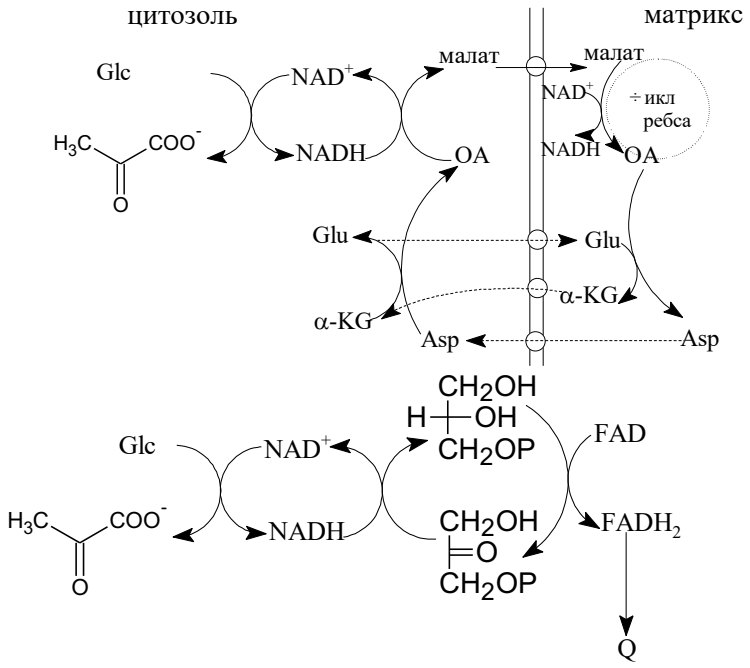


Рис 14.5 Гидролиз в цитозоле и матриксе

При гликолизе из глюкозы получается пируват, при этом сопряженно из NAD^+ получается NADH. Из OA – малат. Малат переносит восстановительные эквиваленты из мембраны. В дело вступает дикарбоксилат-транспортная система, и реализуется противоположная реакция. Малат – в OA. OA не переносится через внутреннюю митохондриальную мембрану. В таком случае, OA – дикарбоновая кислота с одной карбонильной группой. Глутамат – дикарбоновая кислота с аминогруппой в α положении (или амонины, в зависимости от pH). Различаются, помимо карбонильной аминогруппы, количеством атомов углерода. Организм легко может сделать обмен амино- и карбонильной группы. ΔG в районе 0. Реакции трансаминирования. Витамин B6 – пиридоксин. В результате обмена получается из глутамата α-KG, OA – Asp. Они и заносятся через мембрану. Обратная реакция. Челночный механизм называется малат-аспартатным. Иногда используется другая челночная система (менее эффективна). Образуется фосфоглицерин. Фермент – дегидрогеназа. Мембранная форма того же самого фермента возвращает фосфоглицерин в дегридроксиацетонфосфат, но в качестве сопряженного продукта $FADH_2$. Получается на 1 молекулу АТФ меньше. Было принято считать, что на 1 молекулу NADH приходится 3 АТФ, а FADH – 2 АТФ. Сейчас это 2,5 и 1,5 соответственно.

Расчет получаемой энергии из 1 молекулы глюкозы. При полном окислении глюкозы

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

x3 (2)

2АТФ = 2 x1=2

10 (8) NADH x3 = 30 (24) x2,5=25(20)

2GtP x1 = 2

2(4)FADH2 x2 = 4(8) x1,5=3(6)

38 (малат-аспартатная) 36 (фосфоглицериновая) 32 и 30

Процесс полного окисления глюкозы до CO_2 и H_2O энергетически более выгодный. Выгодней вести процесс до конца.

Зачастую АТФ должен использоваться вне митохондрии. *Митохондрия* – энергетическая станция клетки, которая производит энергию, использующуюся везде. В основном в цитозоле. Помимо АТФ-синтазы надо поставлять в матрикс АДФ и фосфат, а выбрасывать АТФ. Транспортная система антипорт и $АДФ^{3-}$ объединяются и производят $АТФ^{4-}$. Для $АТФ^{4-}$ есть транспортная система, которая выбрасывает его. Симпорт закидывает фосфат и протон внутрь. Далее они объединяются и производят АТФ.

В результате прохождения электротранспортной цепи от NADH до воды выбрасывается 10 протонов. На одну АТФ приходится 4 протона.

Энергетический «заряд» клетки (Z). $Z = \frac{[АТФ\ 4-] + \frac{1}{2}[АДФ3-]}{[АТФ]+[АДФ]+[АМФ]}$

Организм в норме при Z = 0,9 до 0,95

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 15

Важность глюконеогенеза

Углеводы – самый быстрый мобилизуемый ресурс организма. 30% энергетических потребностей удовлетворяются за счет углеводов. Процесс синтеза углевода различен у разных организмов. Это определяется возможностью к фотосинтезу. Организмы, не приспособленные к фотосинтезу, синтезируют углеводы не из CO_2 и воды, а из более сложных молекул.

Гликолиз

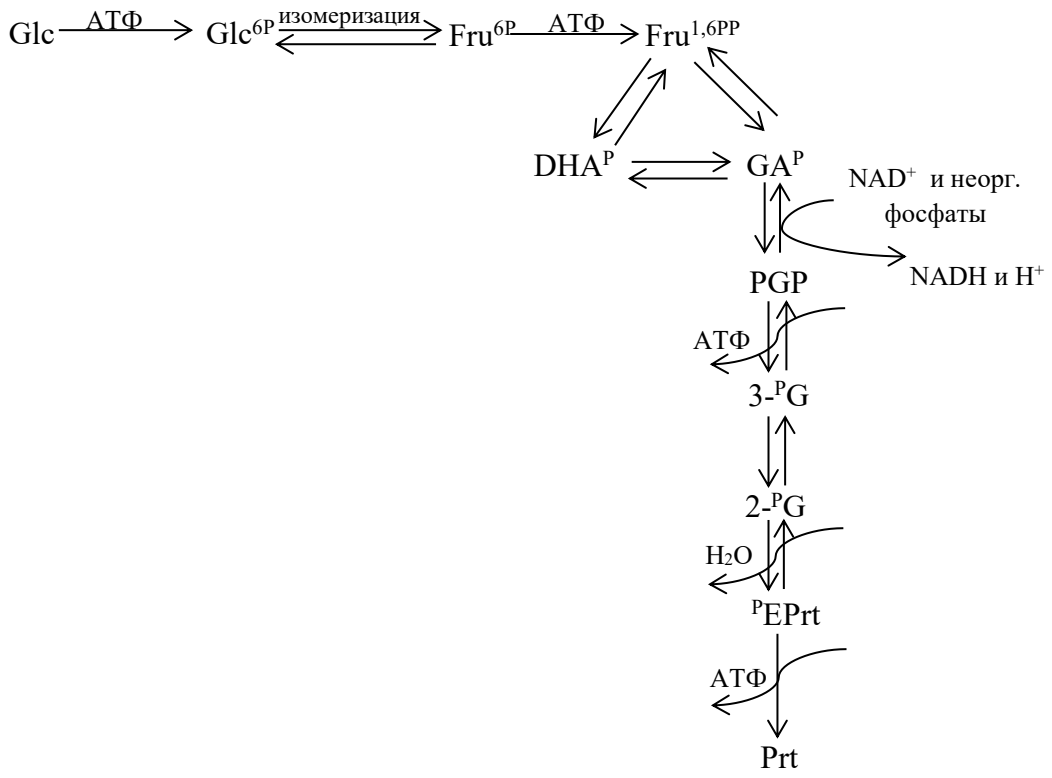


Рис 15.1 Гликолиз

Из глюкозы (Glc) под действием АТФ получается глюкозо-6-фосфат (Glc^{6P}), она изомеризуется, получается фруктозо-6-фосфат (Fru^{6P}), расходуется еще одна молекула АТФ и получается фруктозо-1,6-дифосфат ($Fru^{1,6PP}$). Далее идет расщепление на дегидроксиацетонфосфат(DHA^{P}) и глицеральдегидфосфат (GA^{P}), которые переходят друг в друга.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

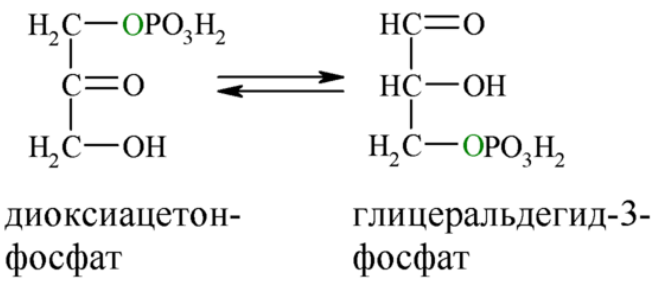


Рис 15.2 Переход диоксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат

На следующей стадии происходит окисление глицеральдегидфосфата с помощью NAD^+, и получается фосфоглицероилфосфат (PGP) – сверхвысокоэнергетическое соединение, которое распадается с образованием АТФ и 3-фосфоглицерата (3-^{P}G), который изомеризуется в 2-фосфоглицерат (2-^{P}G). На следующей стадии 2-фосфаглицерат теряет молекулу воды, и получается фосфоенолпируват (^{P}EPrt). Тоже сверхвысокоэнергетическое соединение, которое фосфорилирует АДФ с образованием АТФ и пирувата (Prt).

На всю схему выигрыш в энергии составляет 2 молекулы АТФ. Из 10 стадий гликолиза 7 являются обратимыми и 3 необратимыми. Необратимыми являются те стадии, на которых происходит максимальная потеря энергии (ΔG max). Суммарная энергия при расщеплении глюкозы до CO_2 и H_2O -686 ккал/моль.

Глюконеогенез

Глюконеогенез – синтез новый глюкозы, включает в себя обратимые стадии гликолиза, а необратимые стадии имеют обходные пути (всего 3), т. к. преодолеть энергетический барьер для протекания реакции в обратном порядке невозможно.

Первый обходной путь

Гликолиз протекает в цитозоле, далее пируват попадает через транспортный путь в митохондрию, в матрикс, и там под действием пируваткарбоксилазы с участием кофактора, биотина, АТФ и CO_2 в результате получается оксалоацетат, но он не может выйти из митохондрии, поэтому оксалоацетат превращается в малат под действием малатдегидрогеназы. (Реакция, обратная циклу Кребса). Малат выходит из митохондрии и под действием цитозольного фермента *малатдегидрогеназы* превращается в оксалоацетат. Далее (анаплеротическая реакция 2) под действием фосфоенолпируваткарбоксикиназы и с расходом молекулы ГДФ получается фосфоенолпируват. Энергетические затраты: ГДФ и АТФ.

Второй обходной путь

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Он заключается в обращении реакции от фруктозо-6-фосфата до дифосфата. Для этого надо провести гидролиз с помощью фермента фруктозодифосфатаза.

Третий обходной путь

Получение глюкозы из глюкозо-6-фосфат с помощью фермента *глюкофосфатазы.*

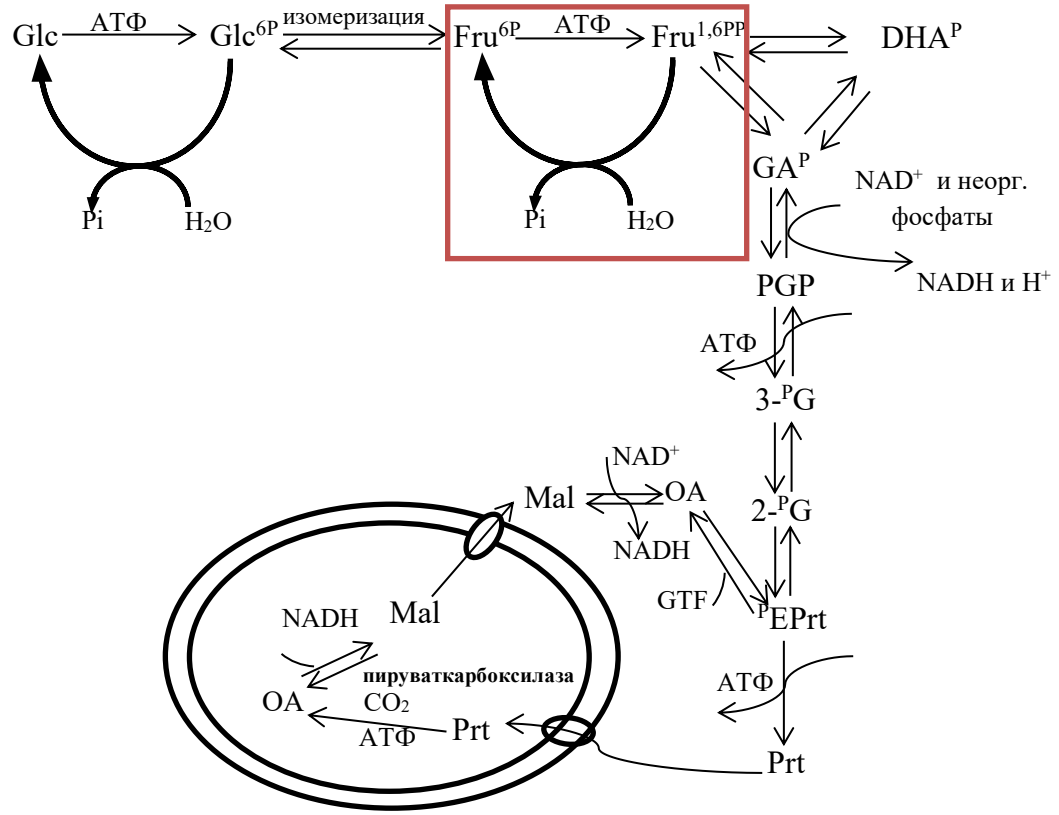


Рис 15.3 Гликолиз и глюконеогенез

Замечание 1. При рассмотрении цикла в красном квадрате видно, что это гидролиз АТФ до фосфата и с выделением температуры.

Замечание 2. Гликолиз и глюконеогенез – процессы, которые должны регулироваться независимо, но согласованно. Независимость реализуется за счет включенности разных ферментов в эти процессы. Согласованность достигается за счет разных эффекторов, но из одного пула. Например, для активации фосфатазы служит АМФ, а для смежной реакции нужна достаточная концентрация АТФ, а одновременное доминирование АТФ и АМФ невозможно. Реципрокный согласованный тип регуляции.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Активатором в реакции превращения пирувата в оксалоацетат является ацетилкофермент А, а для пируваткиназы ацетилкофермент А выступает как ингибитор.

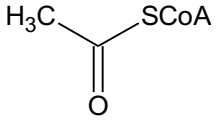


Рис 15.4 Ацетилкофермент А

Энергетические затраты глюконеогенеза: на одну молекулу глюкозы приходится 6 АТФ (ГТФ) и 2 NADH.

Глюконеогенез происходит главным образом в печени и в скелетных мышцах.

Гликоген превращается в глюкозо-1-фосфат под действием гликогенфосфорилазы. Глюкозо-1-фосфат дальше изомеризуется в глюкозо-6-фосфат с помощью фермента мутазы. Путь синтеза гликогена идет через взаимодействие УДП с глюкоз-1-фосфатом после чего получается УДП-глюкоза. Далее синтезируется гликоген с помощью фермента гликогенсинтаза.

Глюкокиназа и гексокиназа катализируют одну и ту же реакцию

$$\text{Glc} \xrightarrow{\text{АТФ}} \text{Glc}^{6P}$$

Таблица 15.1 Сравнение гексокиназы и глюкокиназы

Информация	**Гексокиназа**	**Глюкокиназа**
Распространение	Во многих тканях (везде)	Только печень
Специфичность	Многие гексозы	Только глюкоза
Ингибирование глюкозо-6-фосфатом	Ингибируется	Не ингибируется
Значение константы Михаэлиса Km, mM	0,1	10

Гексокиназа ведет к образованию пирувата и дальше к H_2O и CO_2. Это процесс биохимического дыхания. Глюкокиназа ведет к гликогену.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 16

Жиры

Более богаты энергией, чем углеводы (60%), но метаболизм медленнее. Основная энергия заложена в остатках жирных кислот. Основными источникам жирных кислот в клетке являются Липазы и фосфолипазы, так же они попадают в организм с пищей. Жирные кислоты перерабатываются в митохондриях, но не проникают туда.

Этапы переработки жирных кислот

1) Перенос

Реакции, позволяющие перенос жирных кислот из цитозоля в матрикс митохондрий:

$$1.\ R\text{-}COO^- + CoA\text{-}SH + ATP \rightarrow R\text{-}C(O)SCoA + AMP + PPi$$

При взаимодействии ацилкофермента А и АМФ получается побочный продукт − ацетиладенилат.

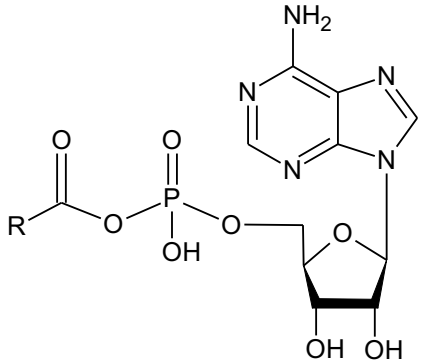


Рис 16.1 Ацетиладенилат

Фермент, катализирующий эту реакцию, *ацилкоферментсинтетаза.*

$$2.\ R\text{-}C(O)SCoA + (H_3C)_3N^+\text{-}CH_2\text{-}CH(OH)\text{-}CH_2\text{-}COO^- \rightarrow CoA\text{-}SH +$$

$$+ (H_3C)_3N^+\text{-}CH_2\text{-}CH(O\text{-}C(O)R)\text{-}CH_2\text{-}COO^-$$

Фермент, катализирующий эту реакцию, *карнитинацилтрансфераза (I.)* В таком виде (соединение с карнитином) аллильная группа попадает в матрикс, где происходит обратная реакция.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

3. $(H_3C)_3N^+$-CH_2-CH(O-C(O)R)-CH_2-COO^- + CoA-SH → R-C(O)SCoA +

+ $(H_3C)_3N^+$-CH_2-CH(OH)-CH_2-COO^-

Фермент, катализирующий эту реакцию, *карнитинацилтрансфераза (II.)*

В цитозоле образуется ацилкофермент, который подходит к первой мембране и реагирует с карнитином при участии фермента карнитинацилтрансферазы (I), который находится около или во внешней мембране. В таком виде (ацилкарнитина) транспортируется через внутреннюю мембрану в матрикс, где находится карнитинацилтрансфераза(II), которая катализирует реакцию образования ацилкофермента А. Таким образом происходит проникновение остатка жирной кислоты в матрикс.

2) Расщепления жирных кислот

(β-окисление) для предельных жирных кислот с четным количеством атомов углерода

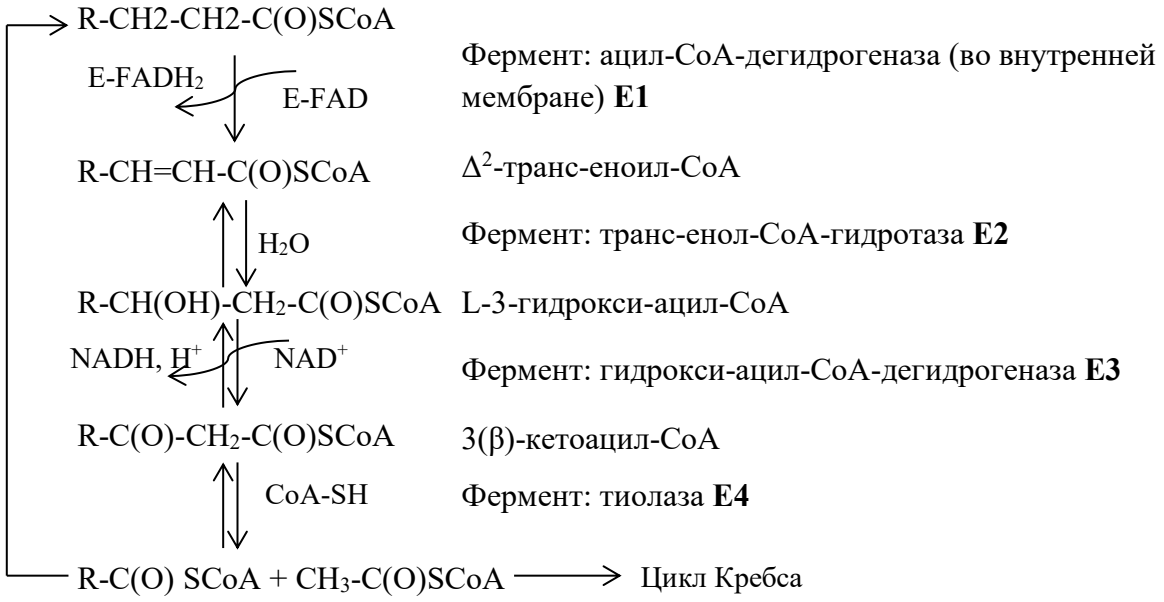


Рис 16.2 Расщепление жирных кислот

При рассмотрении реакции для непредельных жирных кислот возникает проблема, связанная с тем, что в организме они находятся в цис-форме, а в цикле β-окисления – в транс-форме.

Пример с *олеиновой кислотой*: в цикле β-окисления протекает изомеризация двойной связи:

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

$$C18{:}\Delta^{9}\text{-цис} \xrightarrow{\beta\text{-окисление}} C16{:}\Delta^{7}\text{-цис} \xrightarrow{\beta\text{-окисление}} C14{:}\Delta^{5}\text{-цис} \xrightarrow{\beta\text{-окисление}} C12{:}\Delta^{3}\text{-цис} \rightarrow C12{:}\Delta^{2}\text{-транс}$$

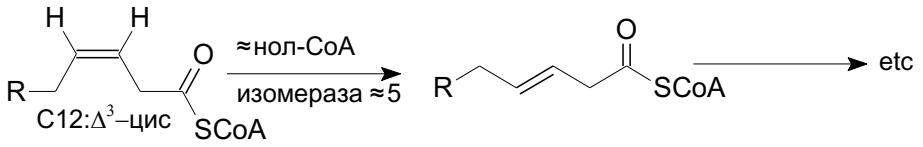


Рис 16.3 Расщепление олеиновой кислоты

Линоленовая кислота содержит две двойные связи. Для нее цикл β-окисления выглядит так:

$$C18{:}\Delta^{9,12}\text{-цис, цис} \rightarrow C16{:}\Delta^{7,10}\text{-цис,цис} \rightarrow C14{:}\Delta^{5,8}\text{-цис,цис} \rightarrow C12{:}\Delta^{3,6}\text{-цис,цис}$$

Рис16.4.1 Расщепление линоленовой кислоты для животных

Далее для разных организмов схема различается. Для животных происходит одновременная изомеризация двойной связи в положении 3 (**E5**) и восстановление двойной связи в положение 6 с помощью NADH, H^+ и редуктазы-**E6**. Для растений протекает сначала изомеризация под действием фермента (**E5**), далее ряд β-окислений и гидратирование.

$$C12{:}\Delta^{2,6}\text{-транс, цис} \rightarrow C10{:}\Delta^{4}\text{-цис} \rightarrow C8{:}\Delta^{2}\text{-цис}$$

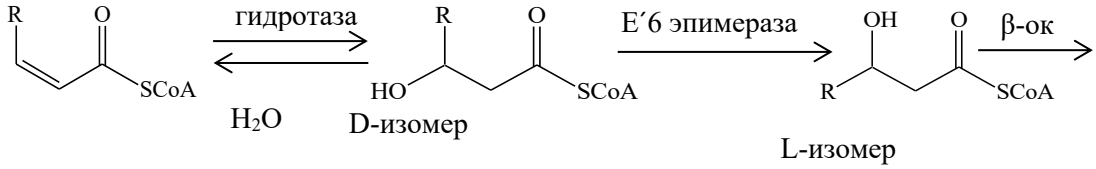


Рис. 16.4.2 Расщепление линоленовой кислоты для растений

Для нечетного количества углерода идет достраивание до четного числа атомов.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

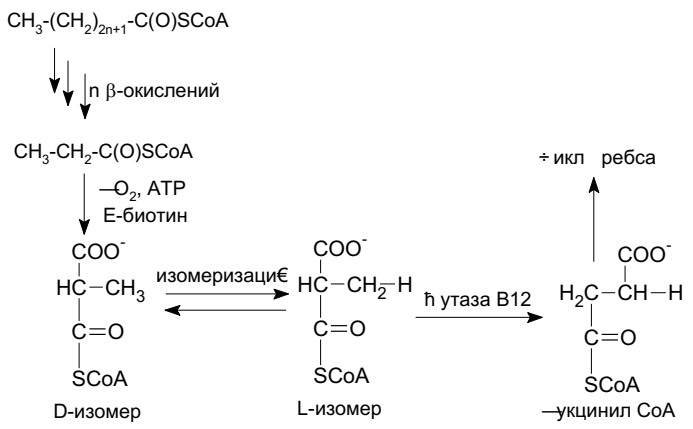


Рис 16.5 Включение в цикл Кребса жирных кислот с нечетным количеством углерода

Рассмотрим реакцию переноса функциональной группы под действием мутазы и кофермента B12 подробнее.

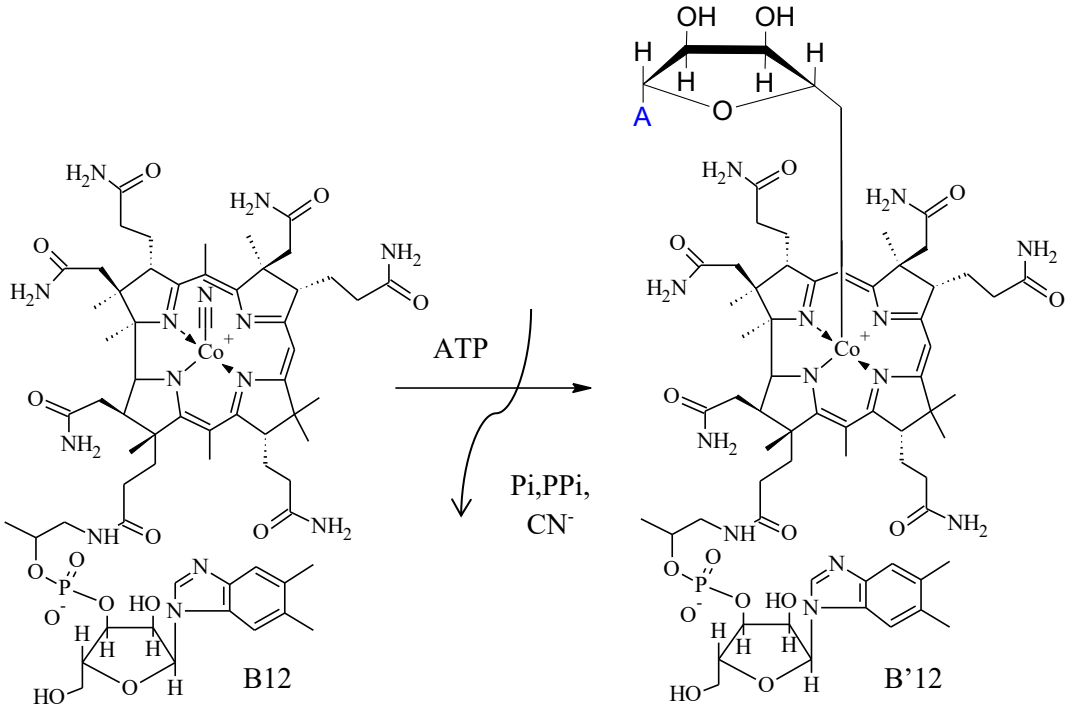


Рис 16.6 Перенос функциональной группы с помощью B12

Витамин B12 реагирует с АТФ, и образуется непрочная связь углерод-кобальт, которая рвется с образованием $CH_2^{\cdot}$, который отщепляет водород, после чего происходит миграция -C(O)SCoA группы, и водород возвращается на ее место, далее связь аденозина с B12 восстанавливается.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

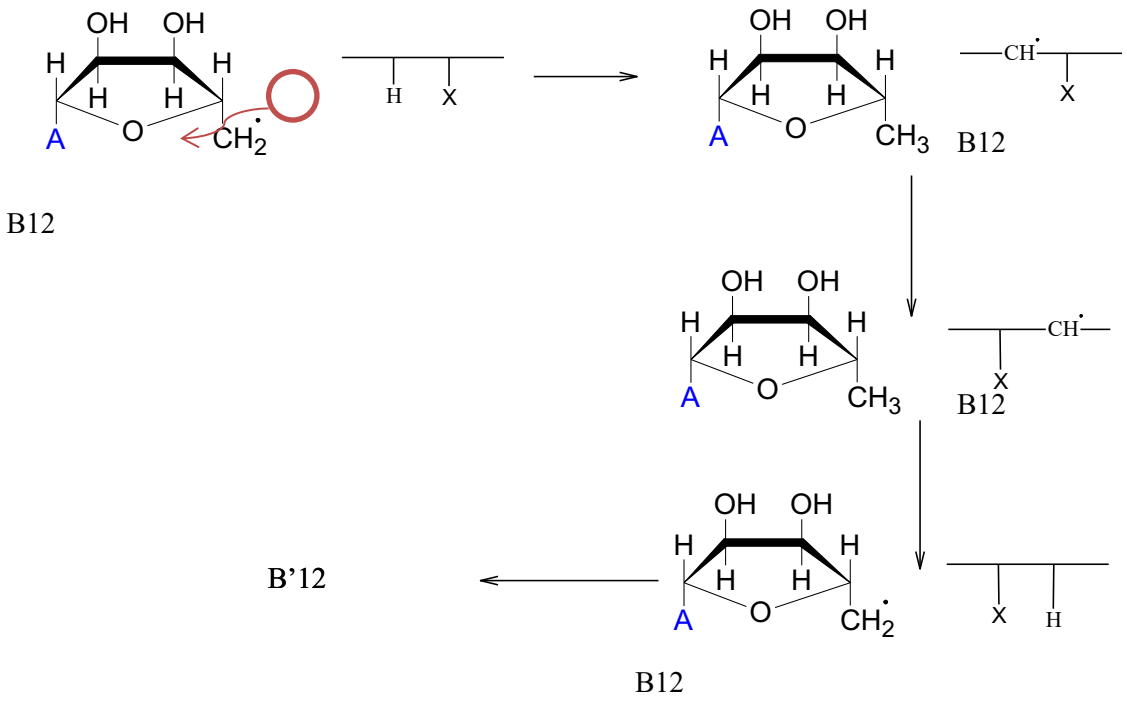


Рис 16.7 Схема трансмутазной реакции

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 17

Анаболизм жирных кислот

Ферменты E1-E6 у разных организмов расположены по-разному.

У *грамположительных* бактерий ферменты E1-E4 находятся в свободном виде в цитозоле. Процесс называется контрдиффузией. У *грамотрицательных* – это тетрамерный белок из E1-E4 ферментов.

У животных клеток E1(для длинных жирных кислот) в мембране, рядом находится E1' (для более коротких) и рядом гексамер, который включает остальные ферменты.

У растений E1 и E4 находятся в свободном виде, и присутствует фермент, который включает все активности E2, E3, E5, E6.

Кетоновые тела

При функционировании печени происходит запасание митохондриями избытка Ac-SCoA. При этом избытке необходимо перенаправить в другие участки тела, в скелетную и сердечную мышцу. Для этого вырабатываются кетоновые тела.

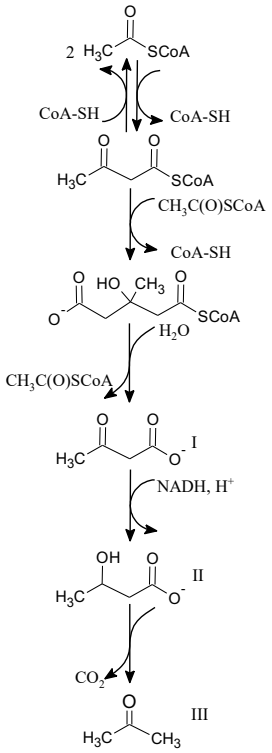


Рис 17.1 Схема синтеза кетоновых тел 1, 2 и 3

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

На первой стадии обратимо конденсируются две молекулы ацилкофермента А. Фермент, который катализируют первую реакцию – тиолаза. Далее присоединяется еще один фрагмент ацилкофермента А и образуется гидроксиметилглутарилкофермент А (ГМГ-СоА). Фермент, который катализируют эту реакцию – ГМГ-синтаза. Далее ГМГ-лиаза катализирует его гидролиз. ГМГ-СоА – это главный метаболит, из него строятся изопреноиды (стероиды, каучуки и т.д.), после гидролиза получается первое кетоновое тело(I) ацетоацетат. Далее под действием NADH образуется второе кетоновое тело – гидроксибутират. Далее при потере CO_2 получается третье кетоновое тело – *ацетон*, который определил название всей группы. Гидроксибутират и ацетоацетат далее поступают в кровь и разносятся по организму. Далее гидроксибутират может окисляться до ацетоацетила. В организме ацетоацетил превращается в сукцинил-СоА, сукцинат и ацетоацетил СоА. Сукцинил СоА и сукцинат являются промежуточными продуктами синтеза трикарбоновых кислот, а ацетоацетил-СоА подвергается каталазной реакции и вступает в цикл Кребса.

Анаболизм жирных кислот

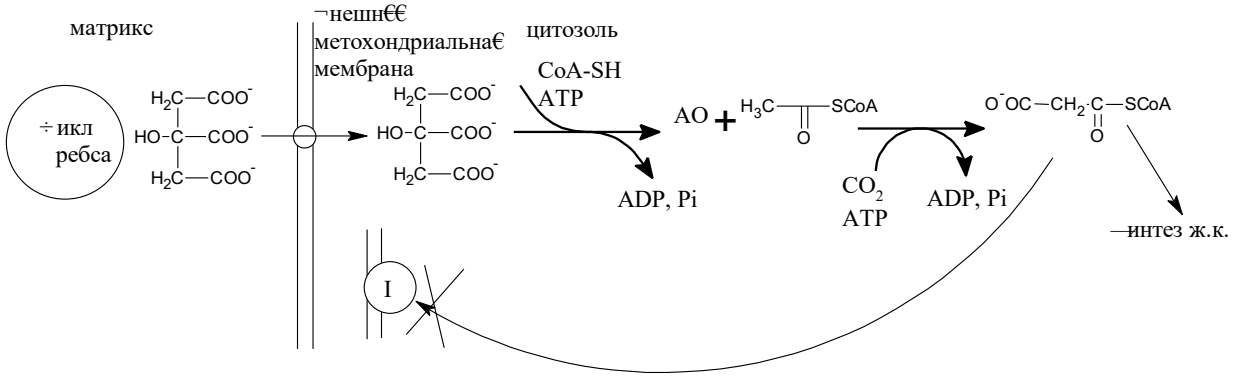


Рис 17.2 Различия в регуляции анаболизма и катаболизма

Рассмотрим ситуацию, когда организм работал, закончил работать, принял пищу и отдыхает. В организме крутится цикл Кребса и нарабатывает цитрат. Когда накапливается много цитрата, он начинает выходить в цитозоль через специальную трикарбоксилаттранспортную систему. И там под действием фермента АТФ цитратлиаза происходит расщепление на оксалоацетат и ацетилкофермент А. Далее фиксируется CO_2 и получается маланилкофермент А. Фермент, который катализирует эту реакцию – ацетилСоАкарбоксилаза, кофактор – биотин. Активатором этого фермента является цитрат. Цитрат является субстратом и активатором. Далее идет синтез жирных кислот. Во внутренней мембране находится Е1 ацилкарнитинтрансфераза, и для нее маланилкофермент А является сильным ингибитором, поэтому катаболизм не идет. Спустя время организм начинает работать, концентрация цитрата в цитозоле убывает, так как он включается в цикл Кребса. По

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

цепочке падает концентрация маланила, он перестает ингибировать ацилкарнитинтрансферазу, которая снова начинает доставлять ацилкофермент А в матрикс.

Таблица 17.1 Различия катаболизма и анаболизма.

Катаболизм	Анаболизм
Идет в матриксе	Идёт в цитозоле
Двухуглеродные фрагменты	Трехуглеродные фрагменты
Кофермент А	4-фосфопатентеин, Cys
L-производные	D-производные

У животных и у бактерий синтез идет до пальмитиновой кислоты, после чего она удаляется. У растений есть возможность сразу делать ненасыщенные жирные кислоты, кислоты с большим и с меньшим числом атомов.

Синтез пальмитиновой кислоты

Катализируется синтазой жирных кислот (различается в зависимости от организма). АПБ-ацил переносящий белок, небольшой белок с молекулярной массой порядка 7 кДа, активная составляющая – 4-фосфопатентеин**.**

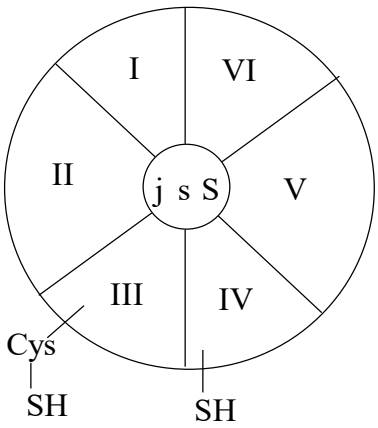


Рис 17.3 Схема расположения ферментов E1-E6

Ферменты:

1) ацил-АПБ-трансфераза

2) маланил-АПБ-трансфераза

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

3) 3-кетоацил-АПБ-синтаза

4) 3-кетоацил-АПБ-редуктаза

5) 3-D-гидроксиацил-АПБ-дегидратаза

6) 3-еноил-АПБ-редуктаза

Под действием E1 идет загрузка 1 ацетилкофермент А на цистеин третьего фермента. Далее под действием E2 идет загрузка 1 эквивалента маланила на четвёртый фермент. Далее улетает CO_2, и идет синтазная реакция, синтезируется кетоацильная производная. Маланил играет роль регулятора и активатора. Далее под действием E4 кетоацильная производная превращается в гидрокси- производную. Далее под действием E5 уходит вода, и получается енолийная производная (двойная связь). Далее под действием E6 получаем бутирил-АПБ. Далее под действием 1 фермента бутирил переносится на 3 фермент.

Глицерин

В организме 3-фосфоглицерин получается из дигидроксиацетона восстановлением под действием дегидрогеназы и фосфорилированием глицерина, который присутствует в организме. Дальше происходит две реакции, в результате которых получается диацилпроизводная фосфоглицерина (фосфатидат).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 18

Синтез липидов

У каждого организма есть отличие в синтезе фосфолипидов, но зачастую эти отличия условны. После производства жирной кислоты приходит гидролаза и отщепляет ацил от переносящего белка, гидролизует и идет на строительный материал для триацилглицеридов и фосфолипидов.

Первый этап. Для синтеза триацилглицеридов и фосфолипидов необходим глицерин фосфат, он получается из дигидроксиацетонфосфата путем дегидрогеназного восстановления, или глицерин из печени с помощью фосфатной реакции превращается в искомый нами глицерин фосфат. Это еще один источник жирных кислот, который с помощью пирофосфата превращается в ацетил CoA. Два ацетил CoA переносятся на молекулу фосфата, и получается очень важное соединение – фосфатидат (фосфоновая кислота)

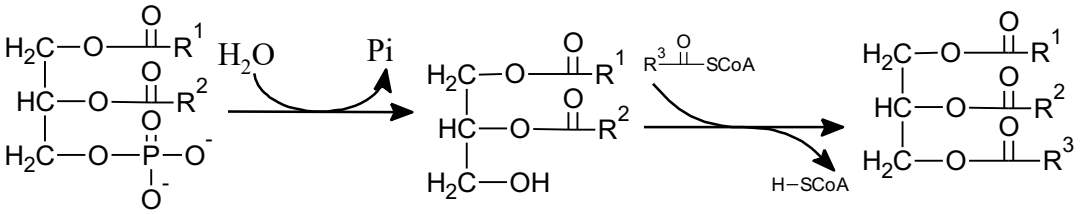


Рис 18.1 Синтез фосфатидата

Несмотря на то, что в животных организмах преобладают насыщенные жирные кислоты, там также присутствуют жирные кислоты с двойными связями, которые образуются в результате следующей реакции.

Оксигеназы – ферменты, которые окисляют субстраты за счет кислорода. Есть *диоксигеназы* и *монооксигеназы* (оксидазы смешанного типа).

Диоксигеназы включают оба атома кислорода в органическую молекулу, чаще разные молекулы.

$$R + O_2 \xrightarrow{\text{диоксигеназа}} R(O) + R_2(O)$$

Пример – окисление пролина. За счет кислорода пролин окисляется по четвертому положению. Образуется гидроксипролин. Второй атом кислорода идет на α-Кетоглутарат, идет его окислительное декарбоксилирование.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Монооксигеназы дают 1 атом кислорода в органическом субстрате и воду. Или возможен вариант с образованием субстрата без кислорода и двух молекул воды.

$$R + O_2 \xrightarrow{\text{монооксигеназа}} R(O) + \acute{K}_2O \quad \text{или} \quad R' + 2\acute{K}_2O$$

При этом R’ является ненасыщенным веществом. Фермент, который катализирует эту реакцию, называется *десатуразой*.

Saturation (англ.) – насыщение

Desaturation (англ.) –лишение насыщения

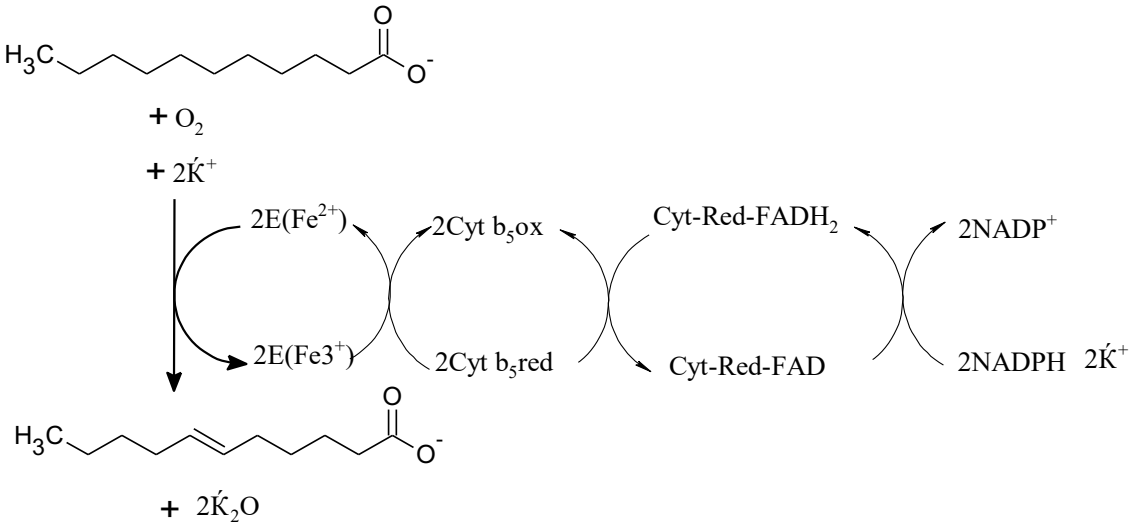


Рис 18. 2 Процесс десатурации

Электроны, необходимые для этой реакции, берутся за счет окисления железа, которое присутствует в ферменте. Для регенерации (восстановления) фермента подходит цитохром, далее его восстанавливает цитохромредуктаза, которая содержит $FADH_2$, Редуктазу восстанавливает NADPH.

Регуляция

Так как в жировых клетках нет гликогена, глюконеогенез идет не до конца, а до требуемых концентраций дигидроксиацетонфосфата. Процесс называется глицеронеогенез. Это важный регуляторный путь.

Главный регуляторный фермент – фосфоенолпируваткарбоксикиназа. Её активность определяет всю активность глицеронеогенеза.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

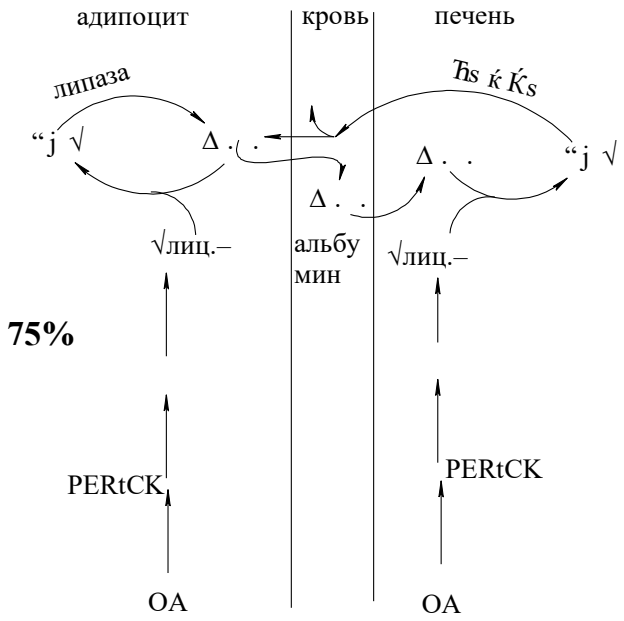


Рис 18.3 Глицеронеогенез

В адипоците жирные кислоты превращаются в триацилглицерид (ТАГ) с помощью глицерофосфата. В печени жирные кислоты превращаются в триацилглицерид (ТАГ) и переносятся в кровь. Результатом является фосфоенолпируваткарбоксикиназа (PERtCK), по сути, иллюстрация глицеронеогенеза.

Также возможна и обратная реакция, катализируемая липазами. Жирные кислоты из адипоцита также попадают в кровь с помощью альбумина. В некоторых клетках они идут на энергию, но часть пойдет в печень, где образуется триацилглицерин, из которого будут сформированы липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП), которые опять попадают в кровь. ЛПОНП по мере расходования превращается в липопротеин низкой плотности, средней и так далее. Некая часть может добраться до жировой ткани и превратиться в ТАГ.

Только 25% жирных кислот идёт на энергетические нужды, а 75% на ресинтез триацилглицерида.

Фосфоенолпируваткарбоксикиназа (PERtCK) не одинаково активна в печени и жировой ткани – ее активность регулируется гормонами адреналин и глюкагон, они похожи друг на друга, но противоположны по действию инсулину. При действии глюкагона замедляется синтез глицеринфосфата, жирные кислоты поступают в кровь. При насыщении крови жирными кислотами организм более приспособлен к энергетическим потерям.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Полярные головы – полярные группы липидных молекул.

Примеры: этаноламиновая голова в кефалине, этаноламиновая трижды метилированая голова по азоту-холин-лецитину, серин, инозит – шестиатомный спирт, кардиолипид, их синтез (см. новый учебник Ленинджера)

Стратегии синтеза фосфолипид

Чтобы сделать фосфолипид, нужно изъять субстрат с СДП.

Для этой цели есть две стратегии:

1) СДП-ацилглицерид (берется из фосфатидата), голова – ОН.

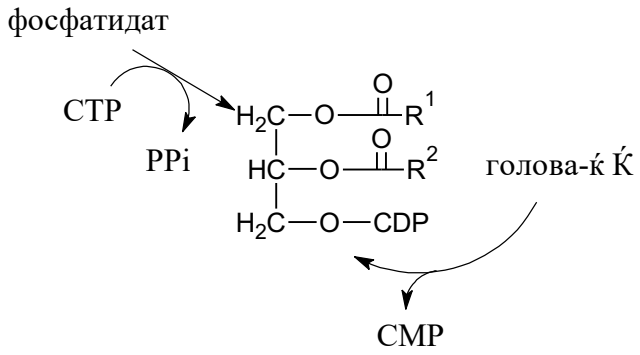


Рис 18.4 Схема первая стратегии

2) ОН-ацилглицерид (берется из фосфатидата), голова – CDP.

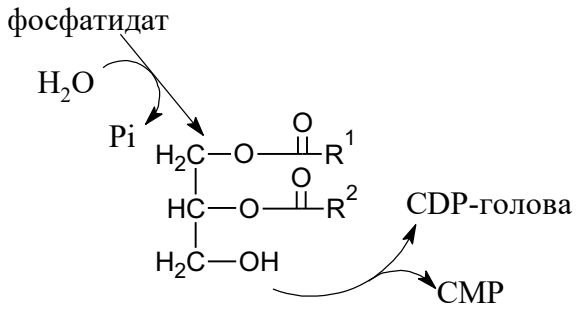


Рис 18.5 Схема второй стратегии

У прокариотов возможен только первый вариант, у эукариотов первый и второй, но вариант 1 для эукариотов и прокариотов различается.

1 стратегия для прокариотов:

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

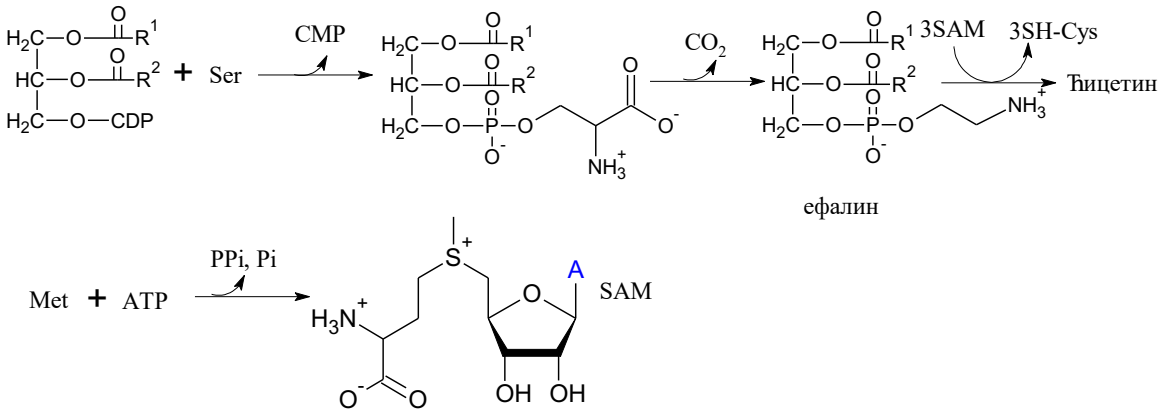


Рис 18.6 Схема первой стратегии для прокариотов

SAM-сильный метилирующий агент.

1 стратегия для эукариотов:

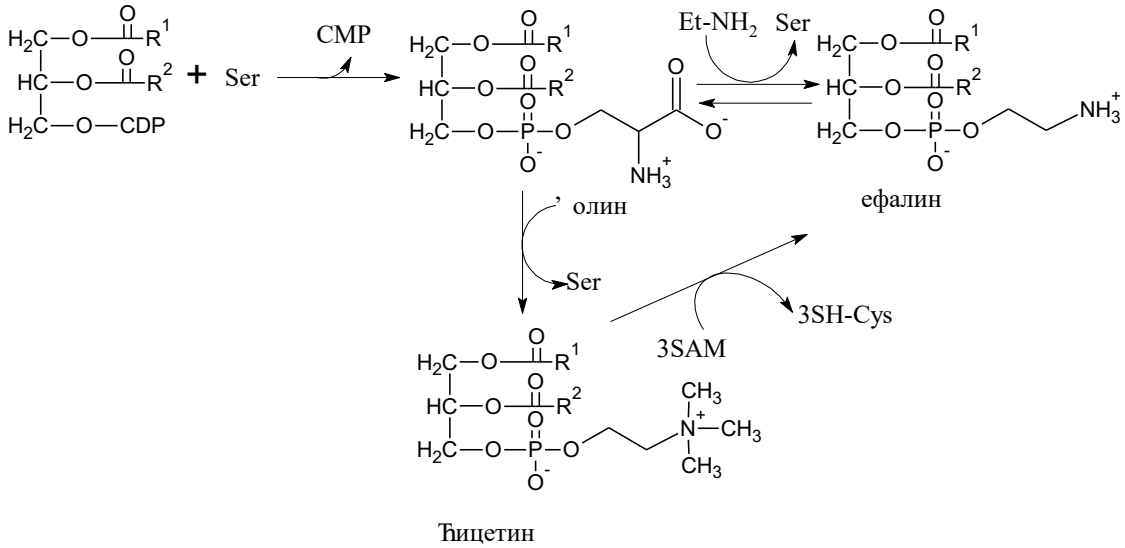


Рис 18.7 Схема первой стратегии для эукариотов

2 стратегия для эукариотов:

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

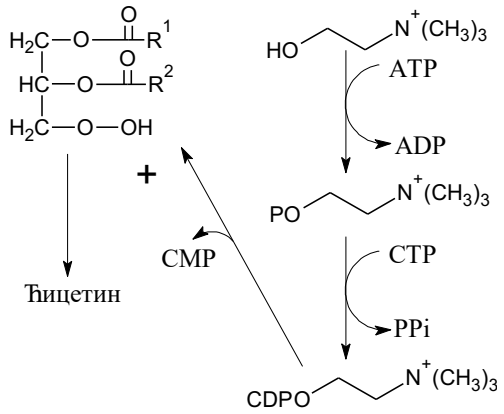


Рис 18.7 Схема второй стратегии для эукариотов

Кардиолипин получается по следующей реакции:

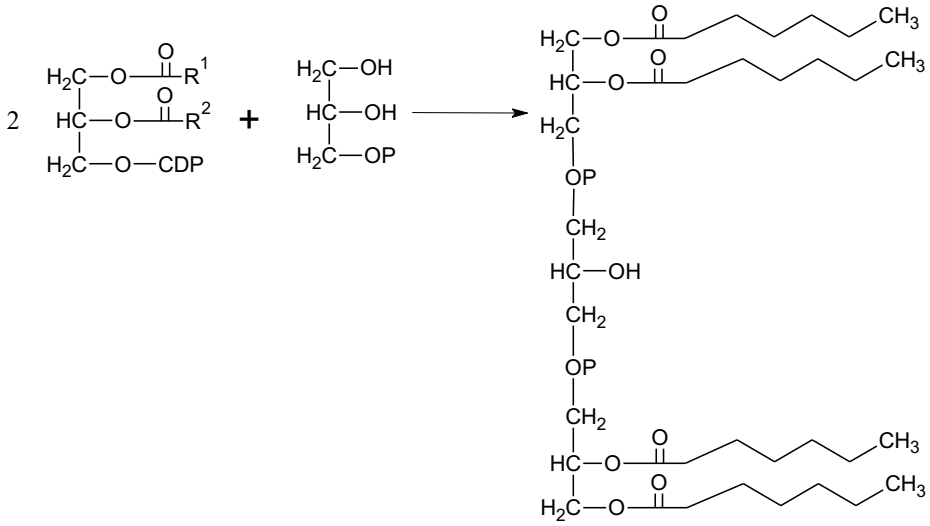


Рис 18.8 Реакция образования кардиолипина

Сфинголипиды

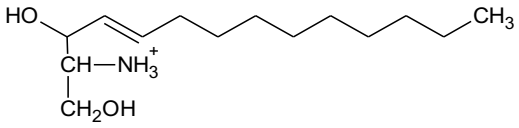


Рис 18.9 Пример сфинголипида

Сфинголипиды получаются из одного эквивалента ацилкофермента А и серина.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 19

Выведение азота. Азотсодержащие соединения

Белки

При разговоре о белках мы рассматриваем их как энергетическую составляющую. Углеводы на 30% удовлетворяют энергетическим потребностям – быстромобилизуемый резерв, жирные кислоты на 60% – более медленный метаболизм, белки на 10% – в первую очередь, аминокислоты. Если разделить еще на 20 незаменимых кислот – получается по 0,5% на каждую. Это говорит о том, что метаболизм белков не полный.

Разные организмы по-разному зависят от белков. Для травоядных животных белки почти не являются источником энергии, для плотоядных – являются, для растений – совсем не являются источником энергии. В случае с бактериями ситуация неочевидна.

Время жизни – от 2 до 200 часов, следовательно, идет интенсивный обмен белков. Неправильно свернутые или денатурированные белки (если их нельзя ренатурировать, то их надо разобрать) появляются вследствие теплового или химического шока. За время жизни белков происходит нормальный оборот белков и разбор неправильных, испорченных. Также идёт переработка белков, поступающих с пищей. Они перевариваются в желудочно-кишечном тракте. Сначала действуют протеолитические ферменты, у которых pH оптимум находится в низких пределах, и желудочный сок, который содержит HCl, pH = 1-2. На этом этапе крупные пептидные цепи разрезаются на олигопептиды, далее они переходят в желудок, где начинается нейтрализация за счет бикарбоната. pH возвращается к нейтральным значениям, начинают работать другие протеолитические ферменты – трипсин, химотрипсин, катепсин, пепсин, которые расщепляются на еще более короткие фрагменты. Последней стадией является действие карбоксиамонидпептидаз, которые гидролизуют отдельные аминокислоты по N и C концам. Амины всасываются в тонком кишечнике, и по кровотоку отправляются на переработку в печень. Отдельные фибриллярные белки разлагаются до более крупных фрагментов и в таком виде перерабатываются в печени. Свои собственные белки деградируют по другим механизмам, но сущность такая же – действие протеолитических ферментов.

Метаболизм аминокислот

Аминокислоты состоят из двух частей: углеродного скелета и азотсодержащей группы($^{+}N(CH_3)_3$). Эти две части разделяются и обрабатываются своим путем. Углеродный скелет проходит цикл Кребса (или близко к нему).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Метаболизм азота

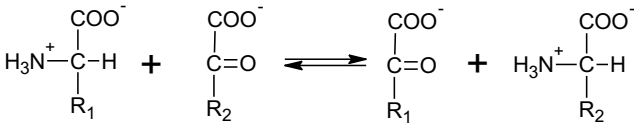


Рис 19.1 Реакция переаминирования

Реакция отделения азота называется *трансаминированием или переаминированием.* (аминогруппа меняется на карбоксильную и наоборот)

Чтобы протекала эта реакция, нужна производная витамина В6 (пиридоксин). Рабочие формы пиридоксина – *пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат.*

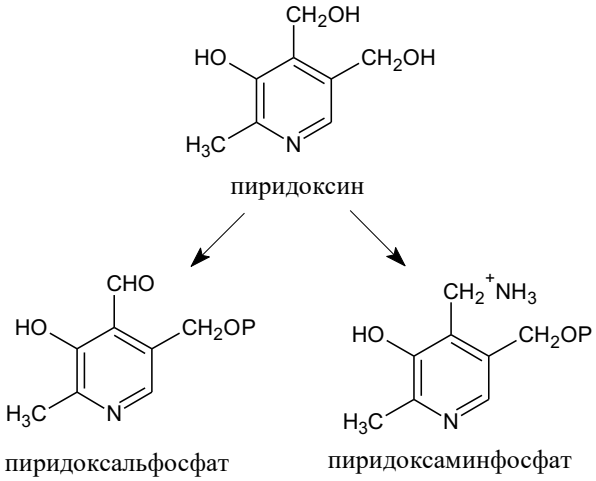


Рис 19.2 Пиридоксин и его производные

Они являются кофакторами. Они прочно связаны с белкой глобулой, связь не валентная, но очень прочная. Один активный центр содержит один кофактор, но его форма меняется на протяжении реакции.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

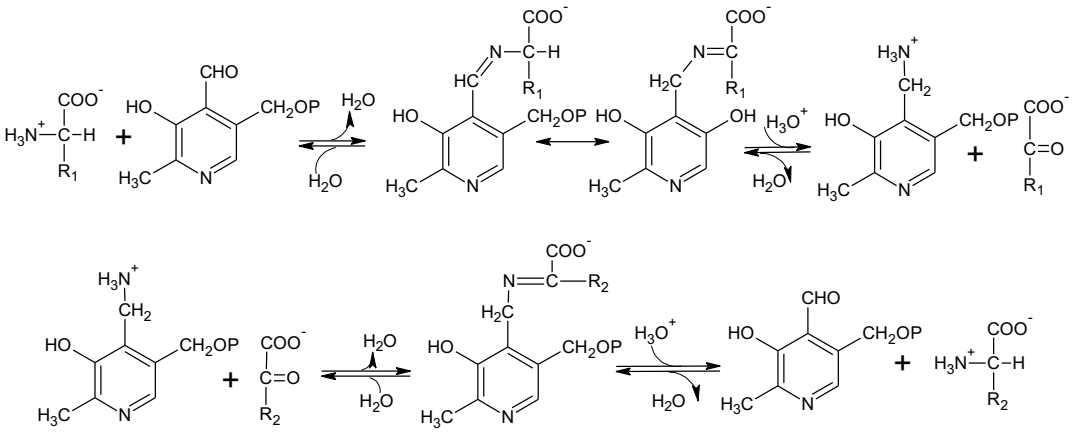


Рис 19.3 Механизм трансаминирования

В первой реакции, протекающей на ферменте, образуется кетокислота и пиридоксаминфосфат, во второй реакции идет регенерация кофактора с образованием новой аминокислоты.

Здесь реализуется механизм *пинг-понг*: реакция фермента со вторым субстратом происходит лишь после образования одного из продуктов ферментативного превращения.

Пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат участвуют также в реакциях рацемизации аминокислот и декарбоксилировании.

Когда фермент не работает, пиридоксальфосфат не выступает наружу, и его закрывает остаток лизина, подходит субстрат и происходит разрыв имеющейся связи и образование новой.

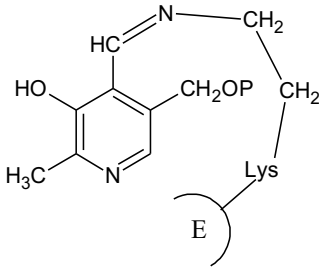


Рис 19.4 Пиридоксинфосфат, экранированный лизином

Однако эта операция не позволяет разорвать углеродный скелет и аминогруппу, а позволяет только передать ее на другой скелет.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Альтернативный путь потери аминогруппы идет в явной форме (достаточно быстро) для глутаминовой кислоты под действием фермента глутаматдегидрогеназы по следующей реакции:

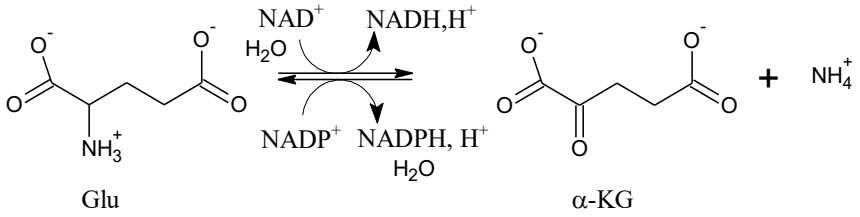
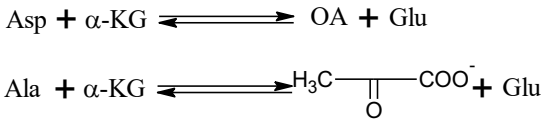


Рис 19.5 Альтернативный путь потери аминогруппы

Фермент работает в обе стороны, является важным элементом, как для катаболизма, так и для анаболизма. Оба процесса регулируются окислительно-восстановительным потенциалом. Так как глутамат может отщеплять аминогруппу достаточно легко, в реакции трансаминирования в качестве кетокислоты выступает α-Кетоглутарат (α-KG).



Далее будем рассматривать отдельно углеродный скелет и амино-функцию.

Аммиак в организме (NH_4^+)

Аммиак в организме токсичен. При попадании аммиака в кровь наступает летальный исход. В организме при нейтральных значениях содержится преимущественно в заряженном виде, но всегда находится в равновесии с незаряженой формой.

$$NH_4^+ \rightleftharpoons NH_3 + H^+$$

В таком состоянии он способен проникать в мозг, проходить через мембрану в незаряженном состоянии, и по обратной глутаматгидрогеназной реакции он может обеднять пул промежуточных продуктов цикла Кребса. В головном мозге это летально, когда ему не хватает энергии.

Механизмы выведения аммиака из организма:

Животные организмы делятся на три типа по механизму выведения:

1. Аммониотелический

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

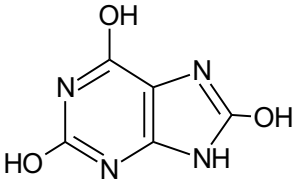
К этому типу относятся рыбы. Аммиак выводят в свободном виде через жабры, он растворяется в воде.

2. Уреотелический

К этому типу относятся звери и человек. Аммиак выводится в виде относительно безвредной мочевины (H_2N-C(O)-NH_2). При больших концентрациях подавляет гидрофобные взаимодействия, то есть может повредить белки. Поэтому выходит в разбавленном виде, концентрация < 0,1М.

3. Урикотелический

К этому типу относятся организмы, которые выводят аммиак в виде мочевой кислоты. К таким организмам относятся птица. Выводится в концентрированном виде.



мочева€ кислота

Рис 19.6 Строение мочевой кислоты

Синтез мочевины

Аммиака много в мышцах, а выводится он в печени. В связи с этим возникает проблема транспорта заряженного и токсичного аммиака через кровь в печень.

Два пути транспортировки аммиака:

а) Первый путь

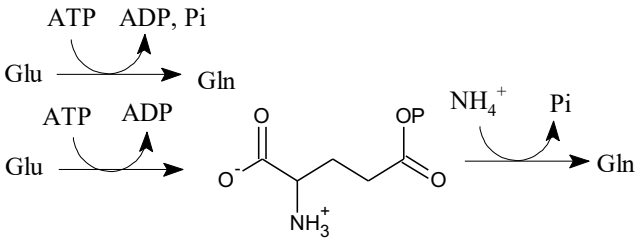


Рис 19.7.1 Превращение аммиака в глутамин

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

В виде глутамина аммиак попадает в кровь, доставляется в печень, где под действием фермента глутаминазы превращается обратно в глутамат, и позже высвобождается аммиак.

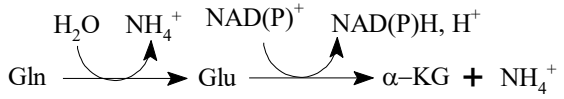


Рис 19.7.2 Высвобождение аммиака в печени

б) Второй путь – это глюкозо-аланиновый цикл

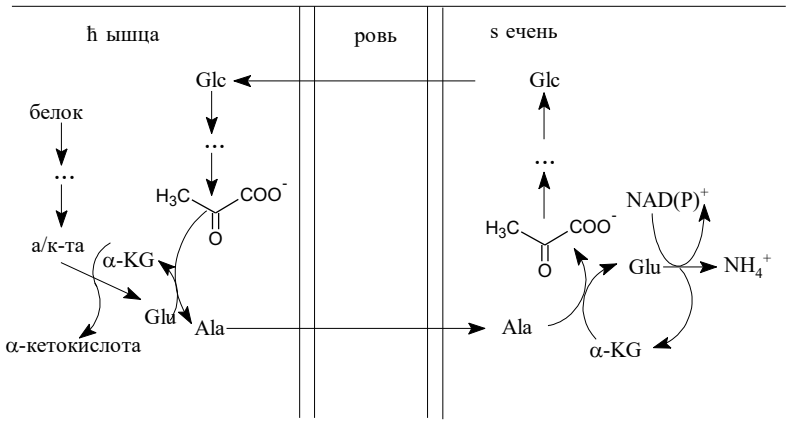


Рис 19.7 Глюкозо-аланиновый цикл

Цикл мочевины (орнитиновый цикл)

Возможен по причине того, что в цикле образуется 2 неканонические аминокислоты, одна из которых орнитин.

Этот цикл также открыл Кребс, и в данном цикле есть мостик к циклу Кребса, поэтому его иногда называют *би-циклом*.

Синтез мочевины протекает в печени:

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

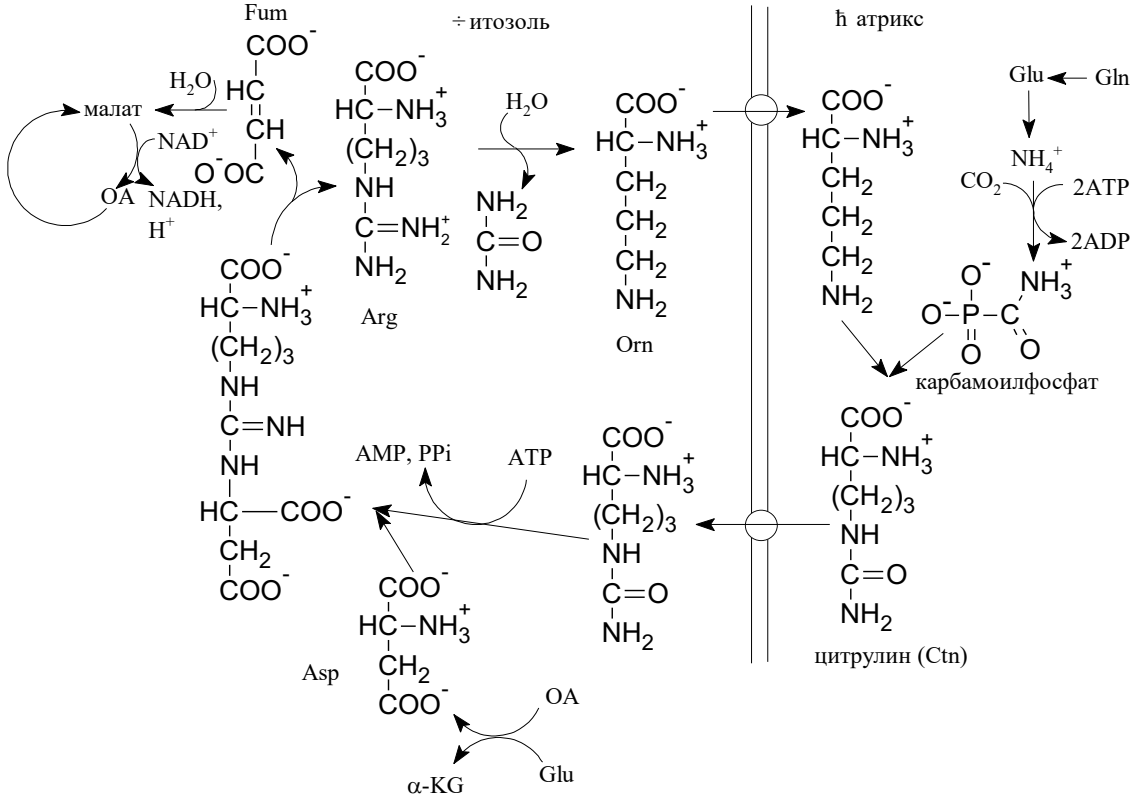


Рис 19.8 Цикл мочевины

Цикл начинается с орнитина (Orn), который проникает через мембрану в матрикс. В матриксе молекула аммиака высвобождается и реагирует с CO_2, на эту реакцию расходуется два эквивалента АТФ. Фермент, катализирующий эту реакцию, называется *карбамоилфосфатсинтетаза*, он находится в матриксе и обозначается цифрой I. В результате реакции образуется карбамоилфосфат, который реагирует с Orn. Фермент, катализирующий эту реакцию, орнитинтранскарбамилаза. Образовавшийся цитруллин (Ctn) выходит в цитозоль. Далее из оксалоацетата и глутамата получается аспаргин и α-KG. Аспаргин вступает в реакцию с цитруллином, и при затрате одной молекулы АТФ образуется аргининосукцинат. Фермент, катализирующий эту реакцию, аргининсукцинатсинтетаза. Аргининсукцинат распадается на аргинин и фумарат. Фермент – аргининосукцинатлиаза. Далее происходит гидролиз до мочевины и Orn. Фермент – аргиназа. Фумарат превращается в оксалоацетат и включается в цикл Кребса, попутно образуется NADH. На синтез мочевины тратится 4 макроэргические связи. Но 2,5 возвращается после переработки фумарата в виде NADH.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 20

Орнитиновый цикл. (Дополнение)

Регулирование цикла за счет фермента карбамоилфосфатсинтетаза (E_I)

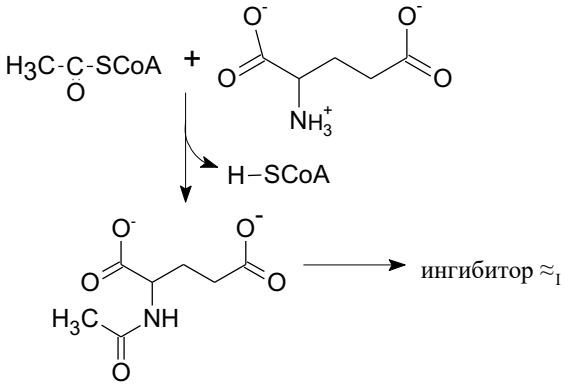


Рис 20.1 Регулирование орнитинового цикла

Когда у организма много энергии и много CoA, синтезируется N-ацетилглутамат, который тормозит цикл мочевины.

Метаболизм углеродной части аминокислот

Сначала нарисуем цикл трикарбоновых кислот (рис. 20.2):

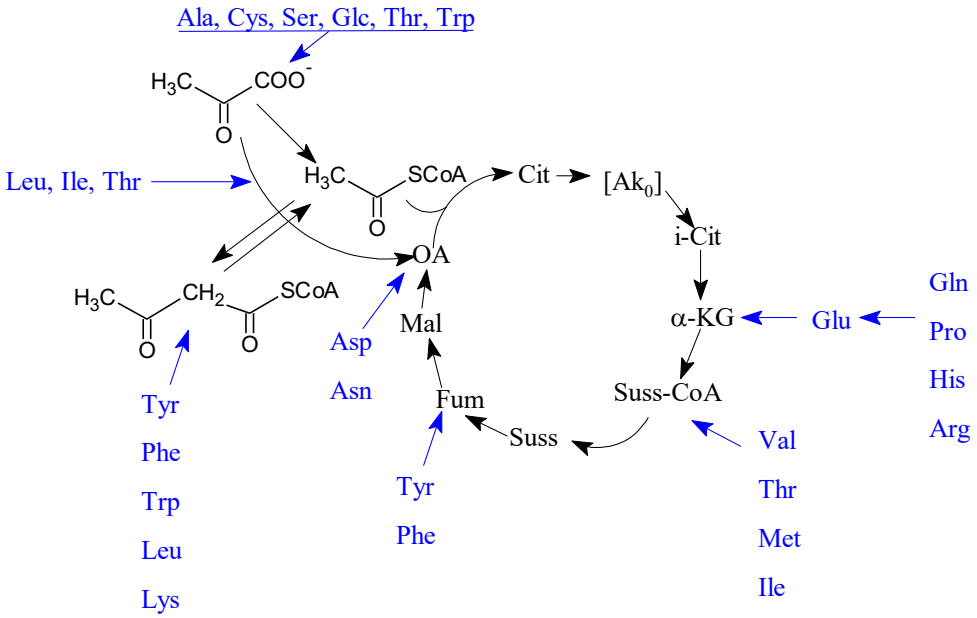


Рис 20.2 Цикл трикарбоновых кислот

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Далее приступаем к введению в цикл аминокислот. Некоторые их них имеют только одну точку входа, некоторые – несколько.

Самые маленькие (Ala, Cys, Ser, Glc, Thr, Trp) являются предшественниками пирувата. Триптофан можно рассматривать, как аналог аланина с двумя циклами вместо атома водорода. Тирозин может преобразовываться в ацетилкофермент А так же как лейцин и изолейцин, со стороны ацетоацетилкофермента А в цикл включаются аминокислоты Tyr, Phe, Trp, Leu, Lys. Tyr, Phe также входят на стадии фумарата. Через α-Кетоглутарат входят Glu, Gln, Pro, His, Arg. Asp и Asn входят так же как оксалоацетат. Трехуглеродные остатки аминокислот перерабатываются как жирные кислоты с нечетным числом атомов, и, в конечном итоге, превращаются в сукцинилкофермент А. Так происходит с Val, Thr, Met, Ile.

Аминокислоты, из которых образуется ацилкофермент А и ацетоацетилкофермента А, могут превращаться в кетоновые тела (кетогенные), остальные аминокислоты могут через оксалоацетат переходит в малат и участвовать в глюконеогенезе. Такие аминокислоты называются глюкогенные. Аминокислоты, которые поступают на кетоновые тела и на глюконеогенез, называются смешанные.

В метаболизме аминокислот участвуют следующие кофакторы:

Доноры одноуглеродных фрагментов:

1. Биотин (CO_2)
2. S-аденозинметионин (SAM)

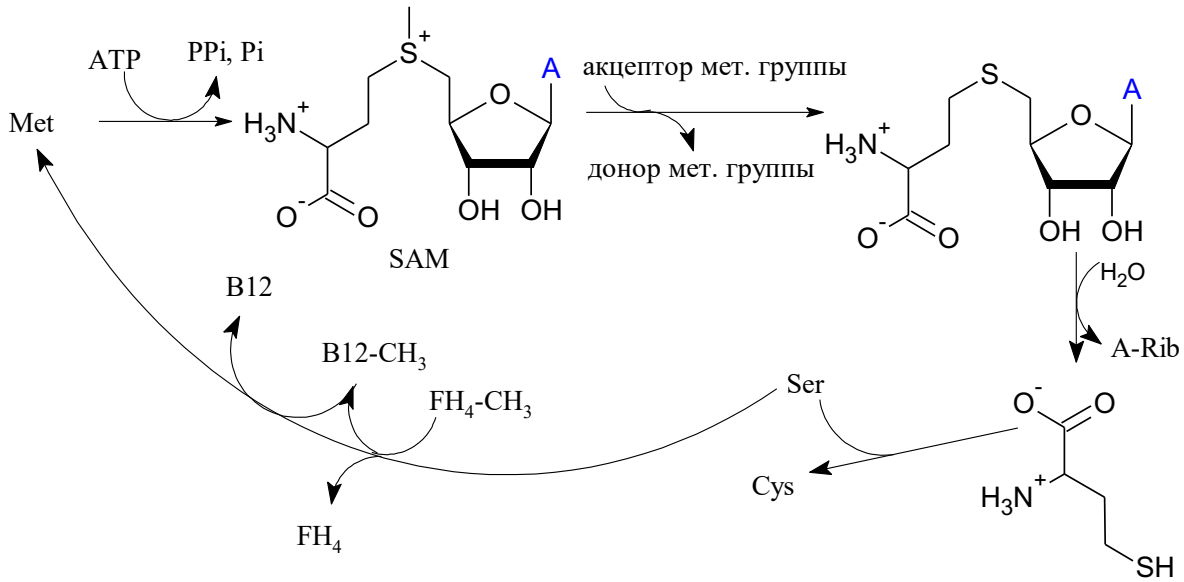


Рис 20.3 Цикл аминокислот

В качестве доноров и акцепторов метильной группы на схеме могут выступать следующие пары: этаноламин – холин, гуанидинкарбоновая кислота – креатин,

норадреналин – адреналин. Далее идет гидролиз S-аденозингомоцистеина до аденозина и гомоцистеина, который может вступать в реакцию с серином и давать цистеин или подвергаться метилированию через метилированный тетрагидрофолат (FH_4-CH_3), но не напрямую. Сначала метилируется витамин B12, а потом его метилированная форма метилирует гомоцистеин.

Напомним: функция витамина B12 заключается только в катаболизме жирных кислот и некоторых аминокислот (val) и в метилировании гомоцистеина. В связи с этим его нужно немного – 2-3 микрограмма в день.

Тетрагидрофолат – кофактор и производная витамина F(фолиевой кислоты), переносчик одноуглеродных групп (X).

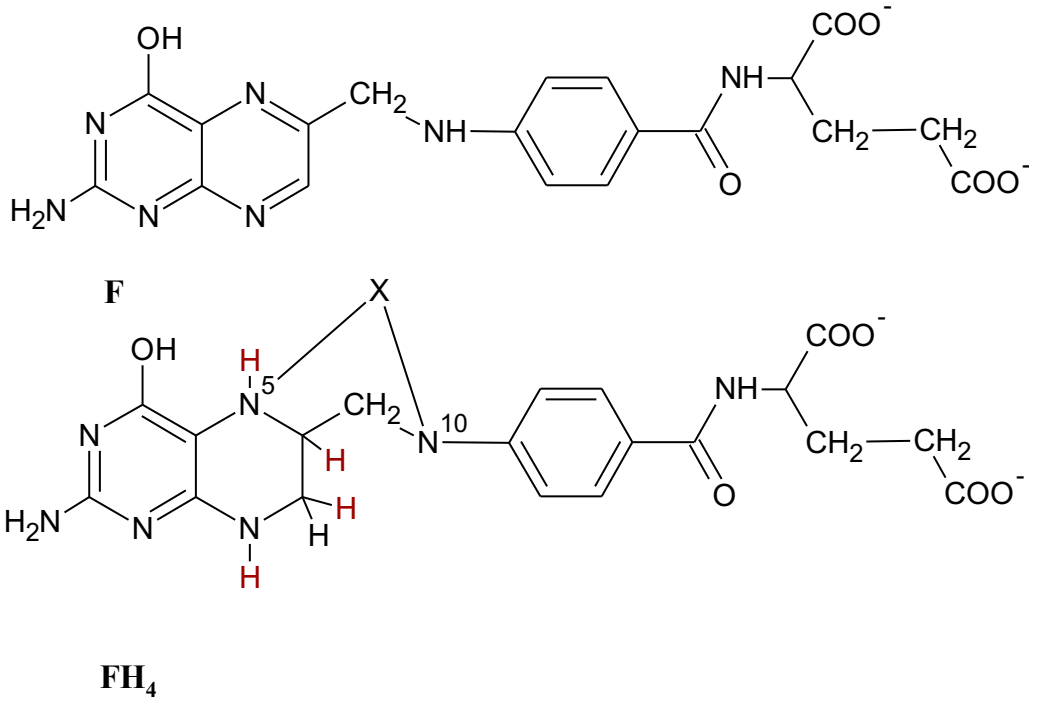


Рис 20.4 Фолат и тетрагидрофолат

Тетрагидрофолат не взаимодействует с окисью углерода.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Один из поставщиков одноуглеродной группы является серин. Он реагирует по следующей схеме:

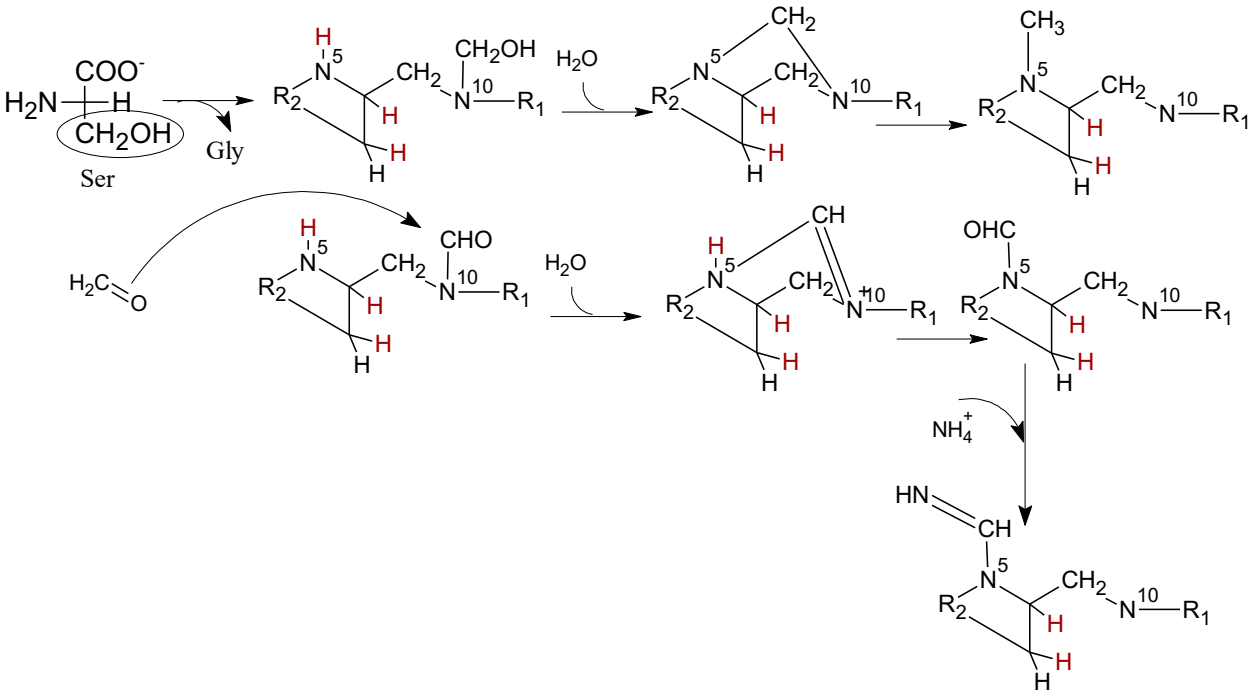


Рис 20.5 Регуляция серина

То есть FH_4 переносит $-CH_3$ и $-CH_2OH$ группы. Также умеет принимать формиат и отдавать его, а если подходит аммиак, то он может отдавать и аминометановую ($–CH_2-NH_2$) группу.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Метаболизм маленьких аминокислотных остатков

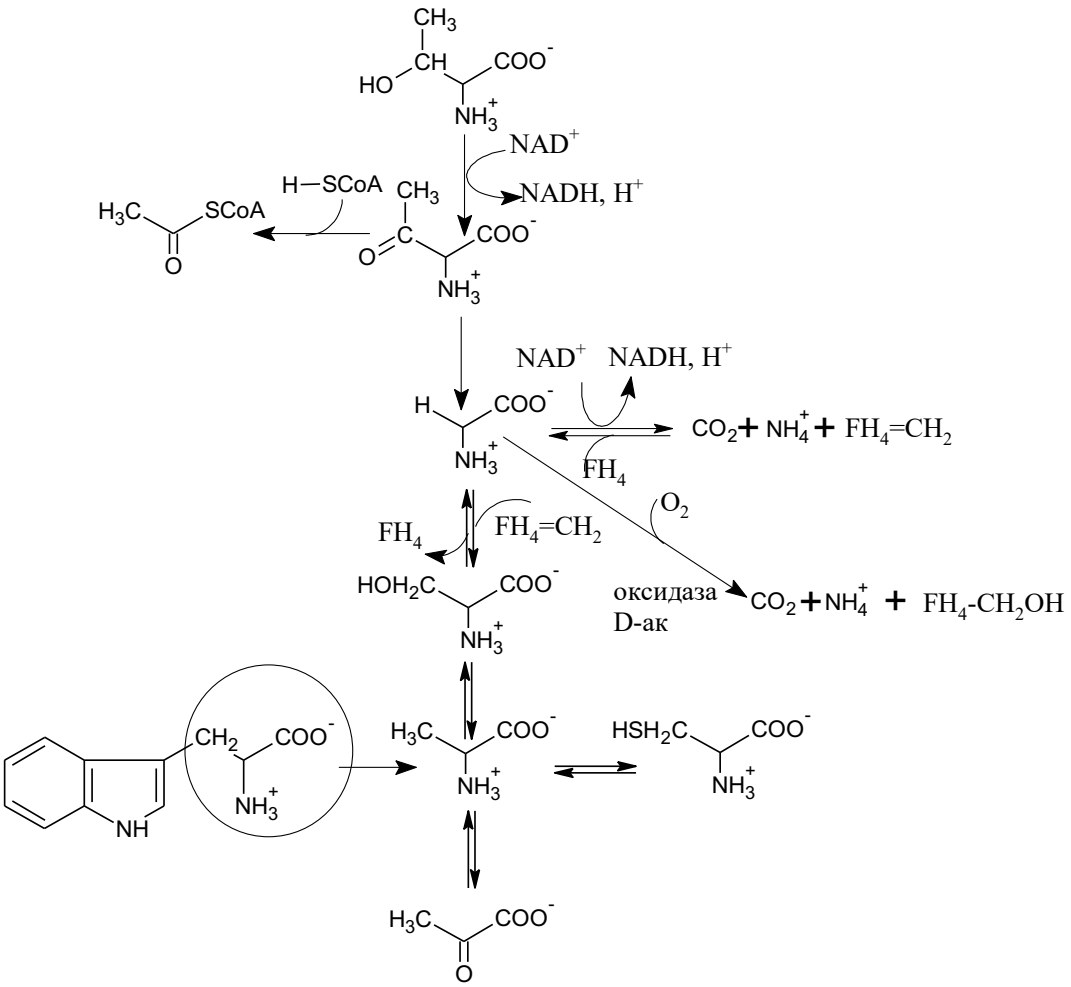


Рис 20.6 Метаболизм маленьких аминокислотных остатков

Начинаем с пирувата – он обратимо получается из аланина, который можно получить из трех аминокислот: цистеина, триптофана и серина, путем замещения функциональной группы на водород. Серин обратимо можно получить из глицина с помощью рассмотренного нами переносчика одноуглеродных групп – тетрагидрофолата. Глицин в свою очередь может отдавать метильную группировку на тетрагидрофолат, а также окисляться оксидазой D-аминокислот, также отдавая метильную группировку.

Оксидаза D-аминокислот присутствует во всех живых организмах. Она нужна, чтобы бороться с поступившими в пищу и подвергшимися рацемизации при приготовлении на огне D-аминокислотами у бактерий в пептидогликане, и для переработки глицина. Для трионина идет окисление спиртовой группы до карбонильной за счет NAD^+, далее идет тиолиз и получается ацетилкофермент А. Но в пируват он входит через глицин, серин.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Фенилаланиновый и тирозиновый путь.

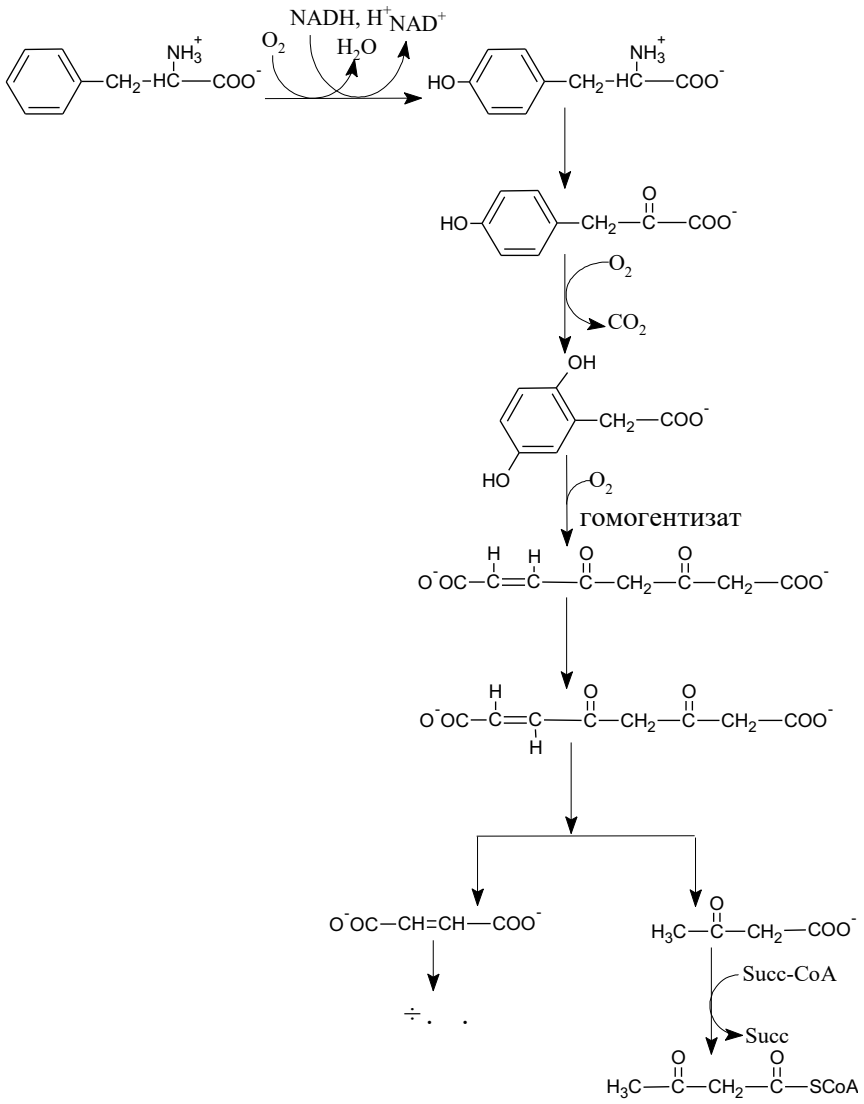


Рис 20.7 Фенилаланиновый и тирозиновый путь

На первой стадии происходит монооксигеназная реакция, образуется тирозин. И анаболический и катаболический путь проходят одновременно. Тирозин может идти на сборку белков или на окисление, если нужна энергия. Фермент, катализирующий эту реакцию, называется фенилаланинмонооксигеназа. Если он плохо работает, то развивается генетическая наследственная болезнь – фенилкетонурия. Она проявляется на ранних стадиях. Так как производные некоторых аминокислот являются медиаторами, то невозможность превращения фенилаланина в тирозин начинает сказываться на умственном развитии, и к 10-12 годам это приводит к летальному исходу. Для людей, страдающих этой болезнью, есть особая диета, которая контролирует содержание фенилаланина в продуктах. Если организм здоров, процесс

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

идет дальше. Происходит трансаминирование, и получается 4 гидроксифенилпируват, который дальше попадает в диоксигеназную реакцию, при этом улетает CO_2, и образуется вещество, которое называется гомогентизат. Цепочка переходит в метаположение, и на её место встаёт OH. Далее протекает ещё одна диоксигеназная реакция с разрывом кольца, в результате которой образуется малеилацетоацетат. Далее он изомеризуется в 4-фумарилацетоацетат. Далее происходит разрыв надвое. С одной стороны, есть фумарат, который идет в цикл трикарбоновых кислот, а ацетоацетат реагирует с сукцинилкоферментом А и образуется ацетоацетилкофермент А, который идет на кетоновые тела, подвергается тиолизу или расщепляется до двух молекул ацетилкофермента А. Так выглядит общая схема переработки фенилаланина и тирозина.

Лекция 21

Анаболизм аминокислот

Аммиак

Азота много в атмосфере, но для людей он инертен и фиксировать азот (т.е. превращать его в другое соединение) может только ограниченный круг бактерий.

Реакция переаминирования важна для катаболизма и анаболизма – α-Кетокислоты и α- аминокислоты могут перекидываться группами через основание Шиффа, задействуя производное витамина B6. Это очень важно. При катаболизме на одном из первых этапов аминогруппа и углеродный скелет будут разделены. Это реализуется на уровне глутамата. Таким образом, α-Кетоглутарат собирает со всех аминокислот аминогруппы, превращается в глутамат, подвергается дегидрогеназной реакции, в результате чего регенерируется α-Кетоглутарат и появляется аминогруппа. Аммиак токсичен. Обитатели суши выводят его в виде мочевины, птицы – в виде мочевой кислоты, обитатели воды в большинстве случаев выводят аммиак, как он есть.

Аммиак токсичен, плохо проходит через мембраны, надо доставлять его от периферических тканей в печень, для этого можно превратить глутамат в глутамин или воспользоваться глюкозо-аланиновым циклом.

Тетрагидрофолат – это универсальный переносчик одноуглеродных групп.

Другой донор – S-аденозинметионин. Особняком стоит глицин. Один путь – превращение в серин, другой путь – быть разобранным на разные группы. По третьему пути глицин окисляется, уходит NH_4^+, и получается гексалат, который дальше окисляется до оксалата. В конечном счете, взаимодействуя с CoA, получается оксалоацетат. Это третий путь глицина.

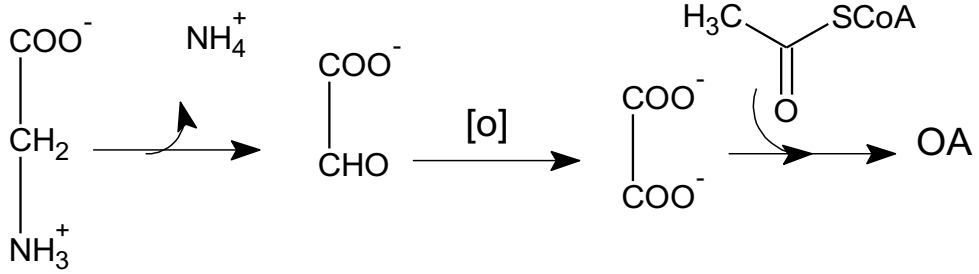


Рис 21.1 Получение OA из глицина по третьему пути

Ключевая стадия – это окисление фенилаланина в тирозин. Это монооксигеназная реакция.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

В α-Кетоглутарат входят: глутамат, глутамин, гистидин, пролин, аргинин.

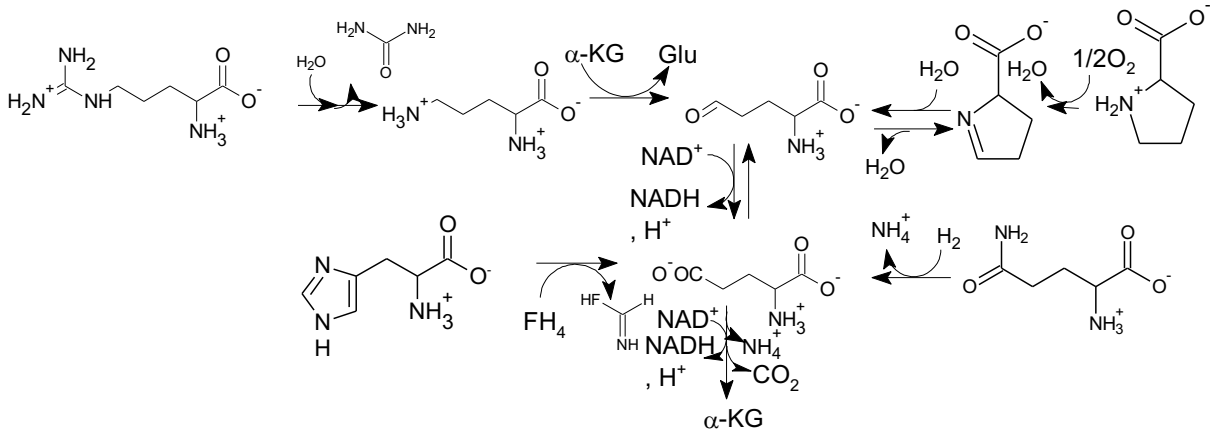


Рис 21.2 Преобразование аминокислот в α-кетоглутарат

Гидролизуется мочевина, и остается орнитин. Весь цикл мочевины переходит в матрикс митохондрии, и цикл начинает крутиться. Если провести δ-трансаминирование, получится полуальдегид глутаминовой кислоты.

Пролилоксидазу нельзя путать с пролилгидроксилазой, которая уводит OH группу в 4-е положение. Реакция обратима.

Глутамин превращается в глутамат через гликолиз, а глутамат – в глутамин с потерей 1 макроэргической связи. Нужно убрать лишний азот и произвести переаминирование.

Последняя реакция при катаболическом пути – дегидрогеназная реакция. NAD или $NADP^+$ до $NADP(H),H^+$, улетает аммиак, улетает вода и получается α-Кетоглутарат. Все реакции здесь обратимы.

Анаболизм аминокислот

Различается для различных организмов. Большинство растений и бактерии умеют синтезировать все канонические аминокислоты. Животные в большинстве случаев умеют делать не все канонические аминокислоты, остальное они добирают из пищи. Человек умеет делать 10 аминокислот, а 10 должен получать из пищи.

10 заменимых аминокислот:

1. Глицин
2. Серин
3. Глутамат
4. Глутамин

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

5. Пролин
6. Аспартат
7. Аспарагин
8. Тирозин
9. Цистеин
10. Аланин
11. Аргинин (получается через цикл мочевины)

1. Глицин может получаться двумя способами:

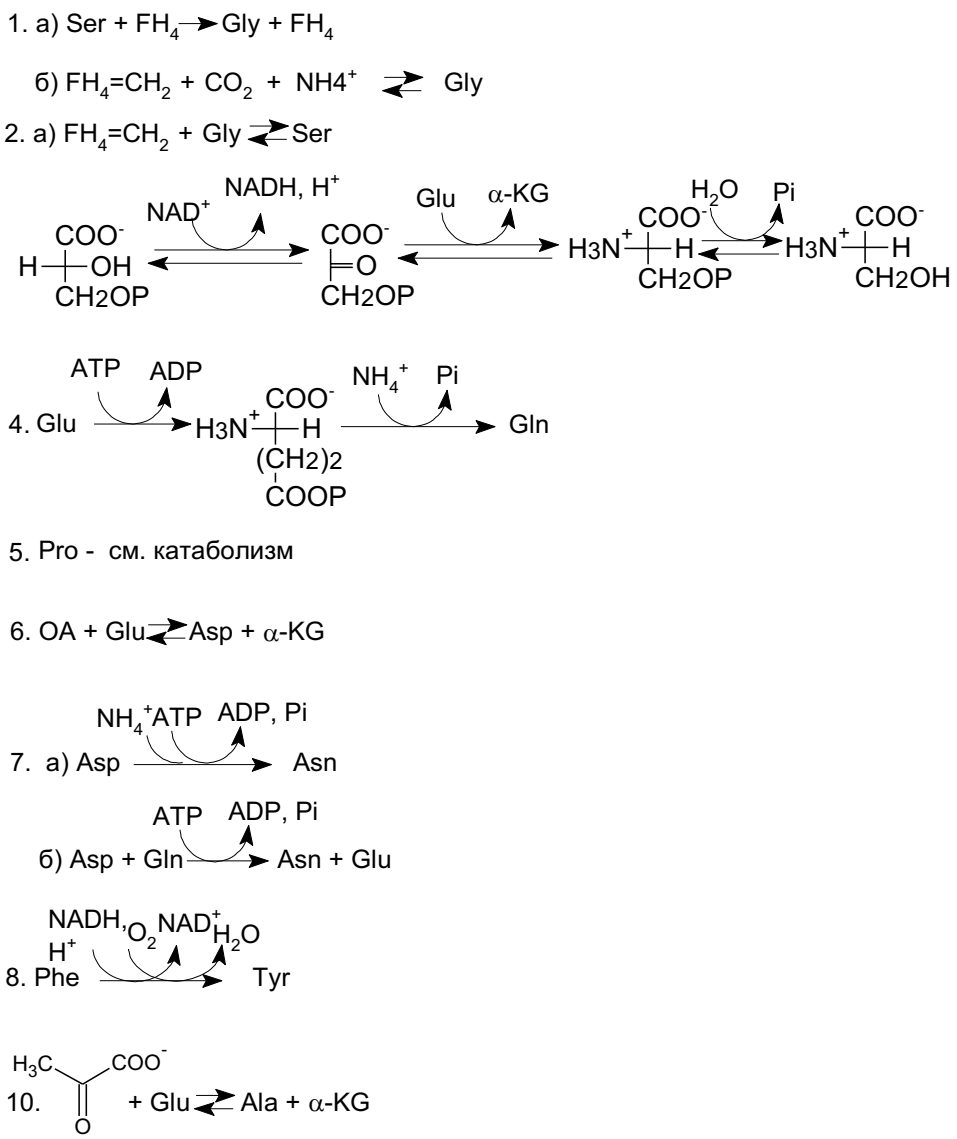


Рис 21.3 Общая схема получения незаменимых аминокислот

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

2. Серин получается из глицина, который содержит гидроксиметильную группу

Также может быть получен альтернативным путём:

3-фосфоглицерат. Нужно окислить группу, сделать трансаминирование и убрать фосфатную группу. NAD^+ идёт до NADH. Получается соединение – фосфогидроксипируват.

3. Глутамат

У бактерий и растений образуется одним способом, у животных – другим. В случае бактерий и растений самая распространённая реакция состоит из двух реакций:

За бактерии и растения

$$NH4^+ + Glu + ATP \longrightarrow Gln + ADP + Pi$$
$$NADH + H^+ + Gln + \alpha\text{-}KG \longrightarrow 2Glu + NAD^+$$
$$NH4^+ + a\text{-}KG + ATP + NADH + H^+ \longrightarrow Glu + ADP + Pi + NAD^+$$
$$NH4^+ + a\text{-}KG + NADPH + H^+ \longrightarrow Glu + NADP^+$$

Это фактически фиксация аммиака на α-Кетоглутарате в двух разных ферментативных процессах.

У животных, растений и бактерий идет ещё такая реакция:

$$NH4^+ + \alpha\text{-Кетоглутарат} + NADPH + H^+ \rightleftarrows \text{глутамат} + NADP^+$$

Вклад в пул глутамата – 10-15%. Очень высокое значение Км по аммиаку. У животных в организме в целом много глутамата.

4. Глутамин

Фермент – глутамин синтетаза. Эта реакция используется и для транспортировки аммиака, и чтобы производить глутамин, который встраивается в белки.

5.Пролин

См. катаболизм в обратную сторону. Глутамат восстанавливается до полуальдегида, образуется двойная связь (получается пирролин). Далее он восстанавливается до пролина.

6. Аспартат

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Протекает переаминирование (см. схему выше)

7. Аспарагин

Фермент для этой реакции – аспарагинсинтетаза. Реакция протекает в печени**.**

Как бы мы не пытались сделать из карбоновой кислоты амид, надо кислоту активировать за счет АТФ.

8. Тирозин. Без поступления фенилаланила его не будет. Тирозин – условно заменимая аминокислота.

9. Цистеин. Также условно заменим.

Синтезируется из одной заменимой аминокислоты – серина – и одной незаменимой – метионина. От метионина берется SH группа, а от серина – углеродный скелет.

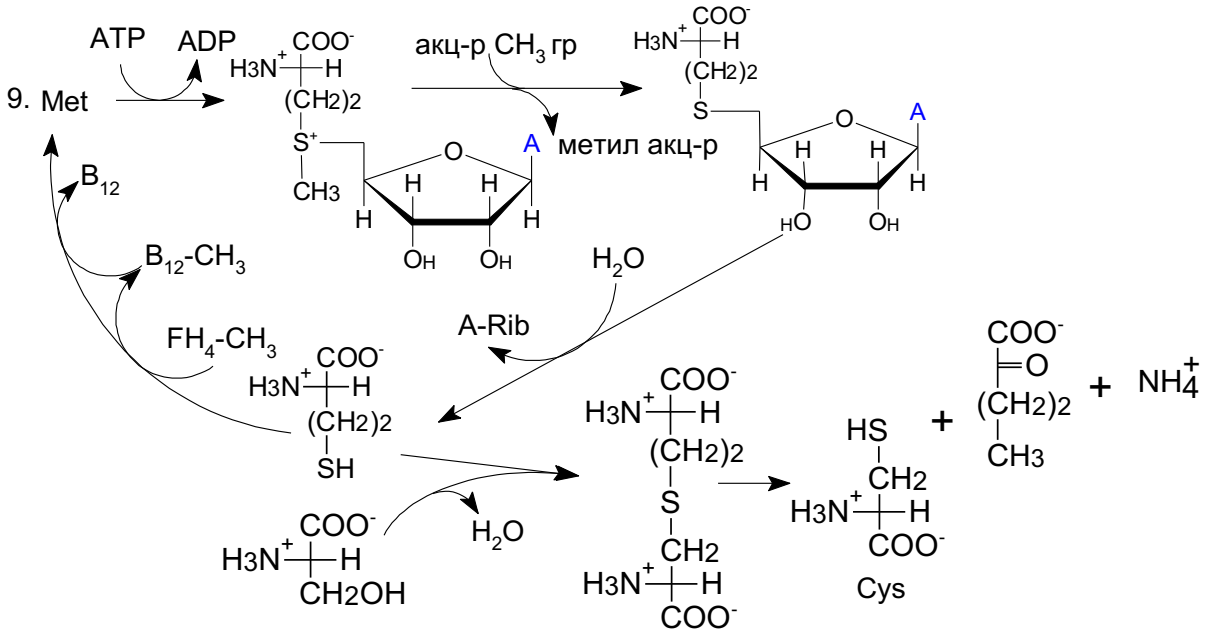


Рис 21.4 Синтез цистеина

Это нестабильное соединение.

S-аденозинметионин примерно в тысячу раз более сильный метилирующий агент, чем тетрагидрофолат, но больше метильную группу взять неоткуда.

Фермент – цистатионин-синтаза, а резать будет цистатионин-лиаза. Снизу остается искомый цистеин, а сверху происходит дезаминирование и получается α-Кетобутират и аммиак.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

10. Аланин

11.Аргинин. Получается из цикла мочевины.

Азотистые основания. Катаболизм пуриновых оснований

АТФ и нуклеиновая кислота деградировали, и получилось АМФ. Далее под действием нуклеотидазы потеряла фосфатную группу, и остался нуклеозид (A-Rb). Пришла нуклеозидаза и сняла сахар. Остался аденин. К нему приходит дезаминаза, которая меняет аминогруппу на ОН или карбонильную (кетоенольное равновесие). Соединение называется *гипоксантин(hypoX).* Дальше происходит окисление, вводится вторая экзоциклическая группа. Соединение называется ксантин. Далее происходит еще одно окисление, и получается мочевая кислота.

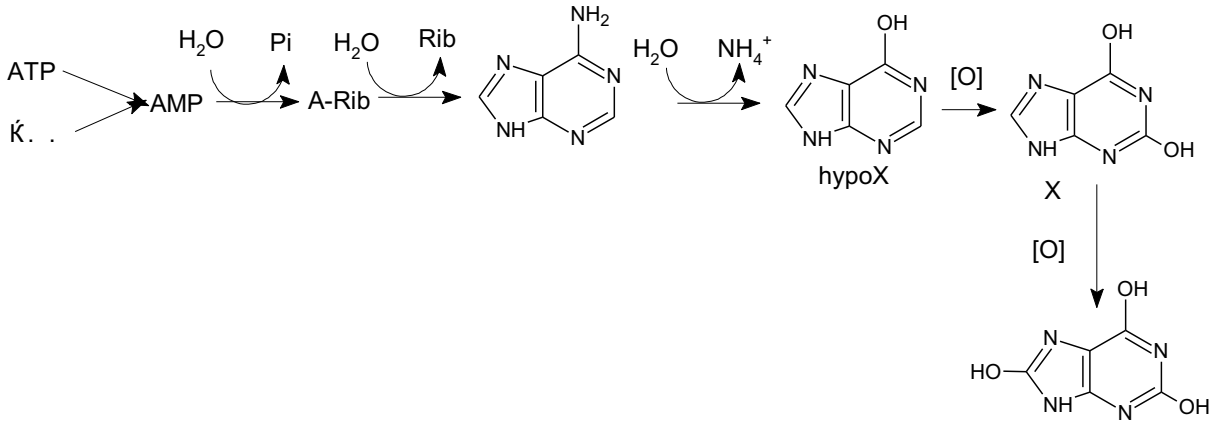


Рис 21.5 Синтез мочевой кислоты

В случае ГТФ:

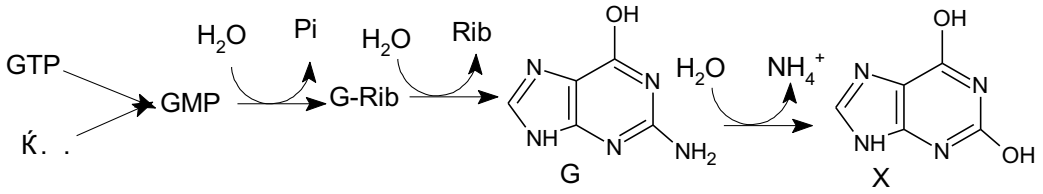


Рис 21.6 Синтез мочевой кислоты в случае ГТФ

ГТФ или нуклеиновые кислоты дают ГПМ, ГПМ под действием нуклеотидазы гидролизуется до гуанозина, а дальше снимается рибоза и остается G.

Различие A и G в количестве экзоциклических групп. В случае A нужно еще одно окисление, во втором случае можно сразу делать дезаминирование и переход на уровень ксантина. Фермент – ксантиноксидаза. Далее движение реакций от

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

гипоксантина к ксантину и от ксантина в мочевую кислоту. Люди выводят в виде аллантоина.

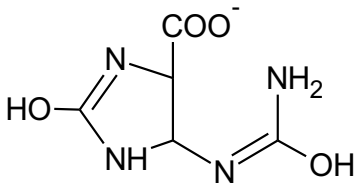


Рис 21.7 Алантаин

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 22

Анаболизм азотистых оснований

Метаболизм нуклеиновых кислот, азотистых оснований, неразрывно связан с метаболизмом аминокислот, особенно это чувствуется в анаболизме. Так как источники азота те же самые, источники углерода – тоже, при катаболизме превращаются в мочевую кислоту и аммиак, которые превращаются в мочевину.

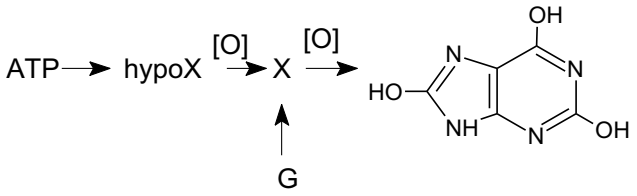


Рис 22.1 Синтез мочевой кислоты. Общая схема

Аденин превращается в гипоксантин. Он окисляется до ксантина. Ксантин окисляется в мочевую кислоту и три раза в ОН. Гуанин сразу попадает на уровень ксантина.

Есть заболевание подагра, в крайних проявлениях не позволяет людям нормально перемещаться, но даже предподагренные состояния неприятны – повышается уровень мочевой кислоты. Болезнь связана с тем, что образуется избыточно много соединения, ураты (в первую очередь, кальция) плохо растворимы. Выпадают уратные кристаллы в суставах, в частях мышц, что вызывает сильную боль. Это возрастное нарушение обмена, которое может возникать и у молодых людей при недостаточном внимании к питанию – обилие жирной пищи, паслёновые (помидоры, баклажаны). Для лечения используется аллопуринол. Это аналог субстрата ксантиноксидаза, где C и N поменяны местами. Ксантиноксидаза забивается этим соединением, и ослабляется образование ксантина.

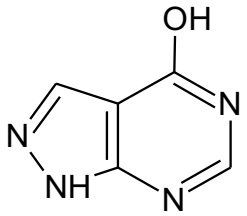


Рис 22.2 Ксантин

Растворимость мочевой кислоты – 0, 5 мг в литре, гипоксантина – 1, 5, ксантина – 0,1. Терапевтический эффект связан с тем, что все излишки можно вывести из

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

организма в виде гипоксантина при достаточном употреблении воды. Иногда бывают осложнения, связанные с образованиями камней других типов.

Предшественник аденина – АТФ.

Анаболизм пуринов

Гипоксантин

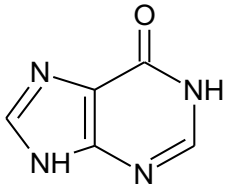


Рис 22.3 Гипоксантин

Помимо азотистых оснований в состав нуклеотидов должна входить рибоза из пентофосфотазного пути в виде рибозо-5-фосфата.

1 стадия:

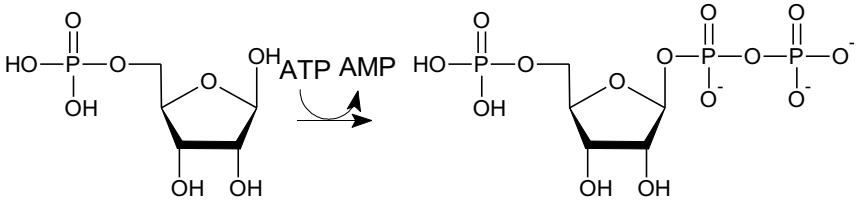


Рис 22.4 1 стадия анаболизма пуринов

За счет АТФ до АМФ происходит активация углерода, за счет которого будет происходить дальнейшая стройка. Получается важный метаболит – *фосфорибозилпирофосфат.PRPP.* Чтобы начать процесс синтеза, нужно потратить две макроэргические связи. Это важная регуляторная стадия. Регуляция по механизму обратной связи. Фермент – фосфорибозилкиназа.

В конечном счете, азотистые основания создаются из фосфорибозилпирофосфата, аминокислот, CO_2 и NH_4.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

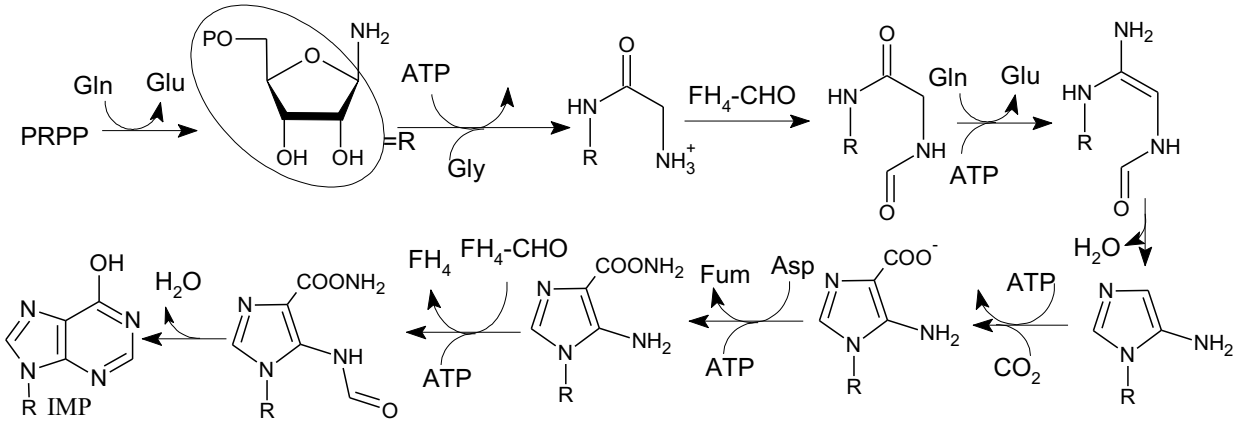


Рис 22.5 Синтез IMP

Гидролиз АТФ не нужен в данном случае. Далее за счет АТФ фиксируется аминокислота. В данном случае – это глицин. Он является поставщиком и атомов углерода и атомов азота. Самый универсальный источник азота – глутамин. Чтобы замкнуть первый цикл, нужен еще один атом углерода. Он приходит из тетрагидрофолата с формильной группой. Это проходит за счет АТФ.

Источниками атома углерода так же являются формил (в виде FH4) и CO_2.

Далее нужен еще один азот. Он берется из аспартата. Аспартат превращается в фумарат. Так же под действием АТФ. Цикл замыкается без затрат АТФ. Получается инозинат IMP. Как продукт инозинат нам не нужен. Нужно A и G.

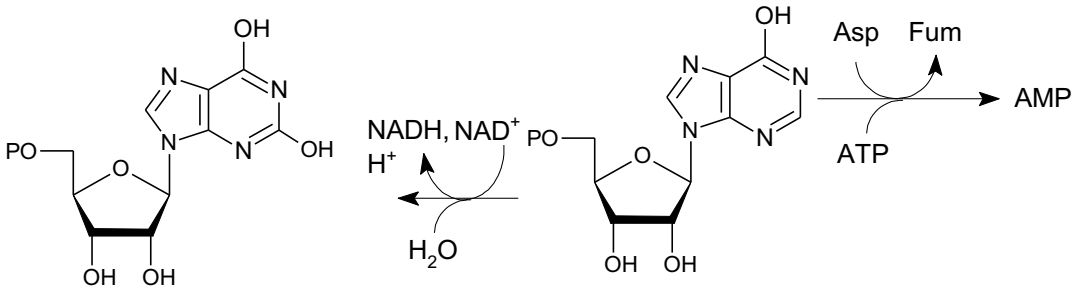


Рис 22.6 Получение A и G

Чтобы получить A, надо фактически поменять OH группу на NH_2 группу.

NAD^+ идёт до NADH, H^+ при участии воды, чтобы взять кислород. XMP это ксантинмонофосфат. В данном случае азот берётся из глутамина. АМП и ГМП будут переведены в АДП и ГДП, а дальше дойдут до трифосфатов. В состав ДНК включаются именно в трифосфатах.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

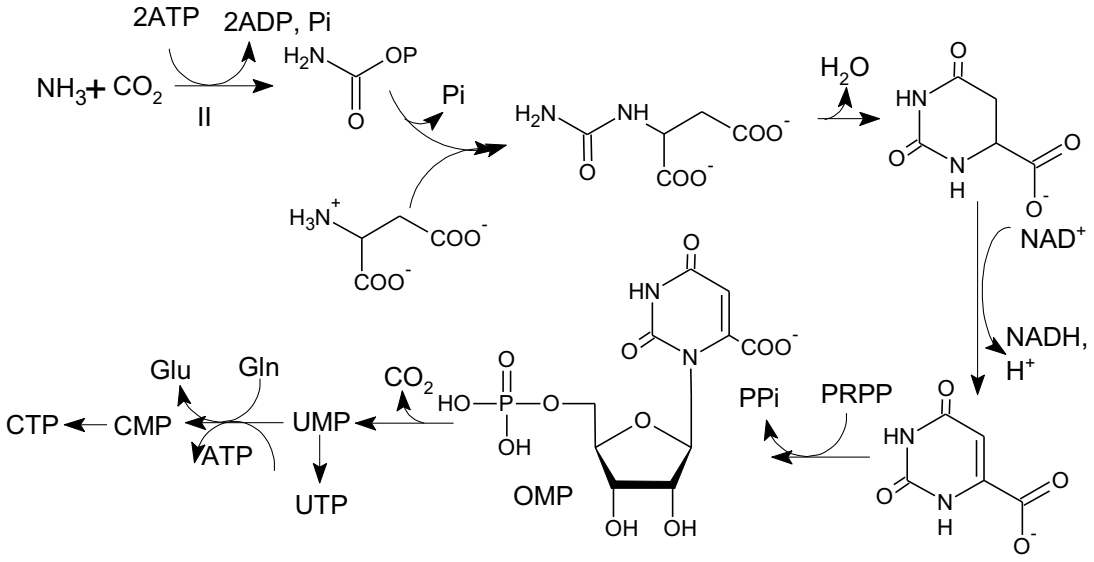


Рис 22.7 Схема получения ЦТФ

Еще один фосфат уходит на активацию карбамоила, получается $NH_2C(O)OP$ карбамоил фосфат. Карбоксилирует это карбамоилфосфатсинтетаза вторая. В качестве аминокислоты выступает аспартат. Под действием аспартаттранскарбомиелазы с вышибанием неорганического фосфата вешается группа и получается амидная группа. Остается потерять воду и замкнуть цикл.

За счет NAD^+ сначала образовывается двойная связь. В данном случае FAD не нужен. Вещество называется *оротат* – пиримидиновое основанием с лишней карбоксильной группой. Соединение до этого *дигидрооротат*. Здесь вступает фосфорибозилпирофосфат. Уходит пирофосфат, и получается ОМП – *оротидилат.* Только здесь происходит стадия декарбоксилирования. Улетает CO_2, и ОМП превращается в UMP. Из UMP далее можно получить CMP. Есть пути к UTP и CTP.

Нужно разложить C, U и T. На эти основания есть два катаболических пути. Тимин метаболизируется сам по себе.

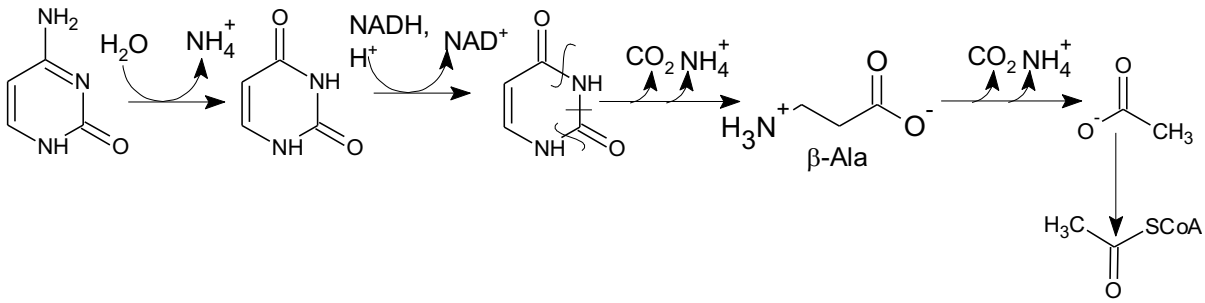


Рис 22.8 Метаболизм урацила

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Сначала C дезаминируется и превращается в U. В первую очередь восстанавливается двойная связь. Получается *дигидроурацил*. Карбамоильные части отрезаются. В конечном счете, улетает CO_2 и NH_4 в мочевину, и остается *β-аланин.* Дальше либо выводится в этом виде, либо окисляется дальше до ацетила, который превращается в кофермент А. Уксусная кислота не полезна для организма, потому что снижается pH. А при сниженном pH начинают активно образовываться камни в почках. Это лечат лимонной кислотой, так как у нее выше значение pH.

В случае тимина:

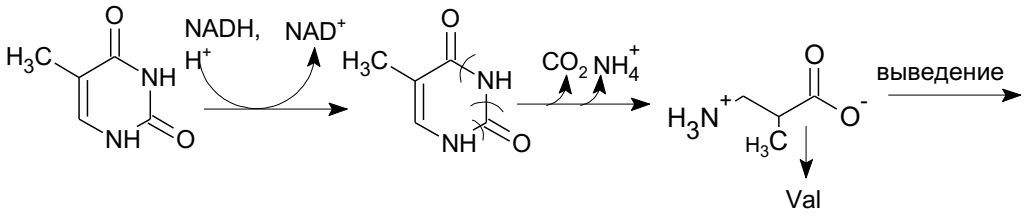


Рис 22.9 Метаболизм тимина

Остается почти то же самое, но появляется группа CH_3. Просто так окисление не произойдет. Это β-аминоизобутират. Он может выводиться как таковой, либо посредством других вариантов по пути к Val.

Откуда появляется метильная группа? Урацил встречается с тетрагидрофолатом, который является донором метиленовой группы. Далее получается производная тимина. В процессе самой реакции идет восстановление. У фолиевой кислоты есть два варианта кофакторных производных: дигидрофолат и тетрагидрофолат.

Восстановление углерода идет за счет окисления тетрагидрофолата до дигидрофолата.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

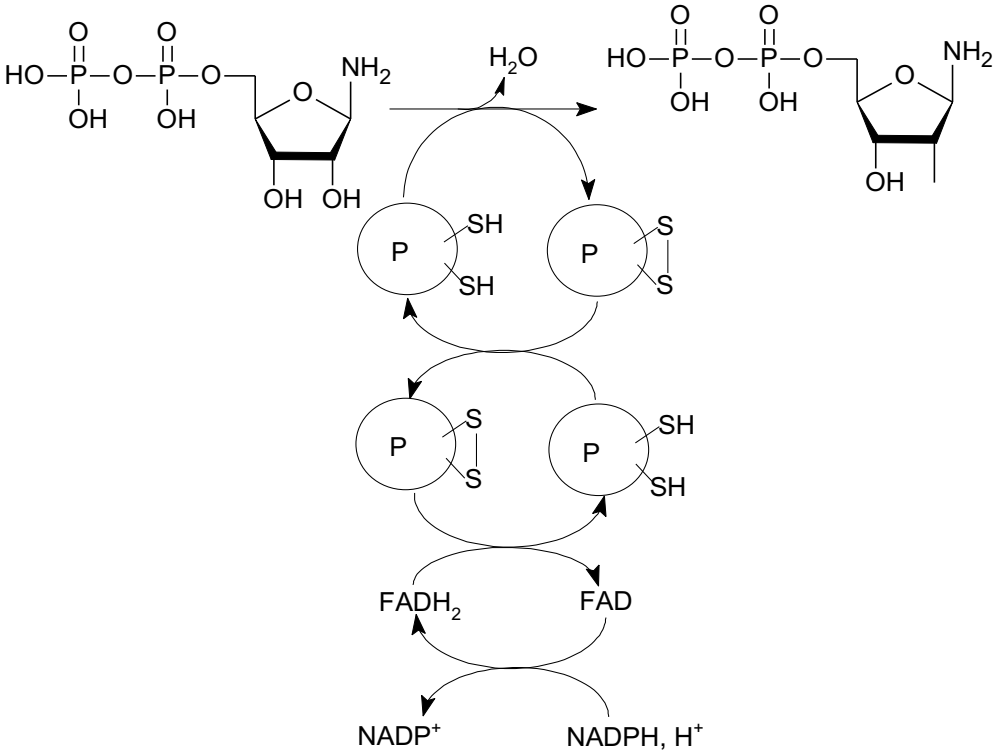


Рис 22.10 Появление метильной группы

N может быть равно A, T, G, C. Идет восстановление за счет серосодержащих белков, при этом окисляется белок. Рядом с тиоредоксином есть тиоредоксин редуктаза. Далее возможны два варианта восстановления: либо за счет $FADH_2$ до FAD, либо через глутатион GSH. В организме в большом количестве тканей окислительно-восстановительный баланс поддерживается за счет глутатиона. Если в какой-то точке окислительный потенциал, будет идти катаболизм, и наоборот.

Глутатион состоит из трех аминокислот – цистеин, глутамат, глицин.

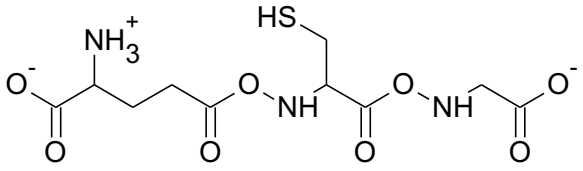


Рис 22.11 Глутатион

Если два глутатиона встречаются, образуется дисульфидный мостик.

Фотосинтез

На земле гораздо больше организмов, которые способны к фотосинтезу, чем неспособных.

$$nCO_2+nH_2O \rightarrow (CH_2O) + ½\ O_2$$

Кислород является побочным продуктом, если основная задача зафиксировать CO_2. Есть организмы, которые способны фиксировать CO_2 за счет энергии солнца, но для которых кислород является ядом. Например, зеленые серные бактерии. Они могут использовать $nCO_2+ nH_2S \rightarrow (CH_2O) + 2nS + nH_2O$

Кисломолочные бактерии используют пару лактат-пируват. Лактат и пируват – доноры водорода.

Общее уравнение фотосинтеза

$nCO_2 + 2nH_2D \rightarrow (CH_2O)n + nD+ 2nH_2O$ под действием солнечного света.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 23

Фотосинтез

Основная цель фотосинтеза – фиксация углерода из внешней среды.

$CO_2+H_2D \rightarrow (CH_2O) + D + H_2O$. Реакция протекает под действием солнечного света. Нас интересует то, что происходит на свету, в кислородной среде. Именно благодаря этому образуется кислород. В качестве донора водорода выступает вода.

$CO_2 + H_2O \rightarrow (CH_2O)_n + ½\ O_2$. На первый взгляд, возникает парадокс, ведь вода в одном случае слева, а в другом справа. На самом деле парадокса нет, потому что в случае образования кислорода, H_2D превращается в H_2O, и они сокращаются.

Процесс фотосинтеза – это фактически два процесса, так как для фиксации углерода нужна энергия, и можно разделить на отдельный процесс фиксации энергии и превращения энергии солнечного света в химическую энергию, и на параллельно идущий синтез углеводов, из которых можно синтезировать необходимое. Эти два процесса сопряжены через высокоэнергетические соединения. В фотосинтезе есть световые стадии и темновые. На световой стадии под действием солнечного света из ИДП и фосфата синтезируется АТФ, а также из $NAD(P)^+$ синтезируется NADPH, H^+. На темновых стадиях эта энергия тратится, регенерируется АДФ и $NADP^+$, но здесь из CO_2 и H_2O получаются CH_2O и O_2. Световые стадии идут только на свету, а темновые стадии идут и на свету, и в темноте.

Фотосинтезом могут заниматься зеленые части растений (через специальные органеллы – хлоропласты), а также различные бактерии. Отдельная группа – цианобактерии или зеленые водоросли.

Хлоропласт имеет внутреннюю и внешнюю мембрану. Внешняя мембрана имеет большие поры, внутренняя мембрана (тилакоидная мембрана). Тилакоиды сбиваются в граны, которые соединены друг с другом *ламеллами*. Внутри тилакоидов распространяются фотосистемы. Фотосистема содержит светопоглощающие молекулы и реакционный центр. 1 центр на 1 фотосистему. В случае растений светопоглощающие молекулы содержат хлорофиллы. Хлорофиллы представляют собой парафиновое кольцо, но в отличие от B12, содержащего кобальт, хлорофиллы содержат магний и множество разных заместителей. Система сопряженных двойных связей. Есть остаток кислоты, к который присоединен 15-тиуглеродный спирт – фитол. Хлорофиллы бывают с разными максимумами поглощения (зависит от того, какие заместители присутствуют в кольцах). Помимо хлорофилла могут быть дополнительные пигменты, например, каротин.

Получается система, в которой много пигментов, которые умеют поглощать свет, и есть только одна антенна. Она связана с комплексом белком и связана с центром и способна преобразовать энергию солнечного света в химическую энергию. Все антенны, что поймали кванты света, переходят в возбужденное состояние, начинают вступать в химические реакции и передают это возбуждение ближним антеннам, пока они не дойдут до реакционно способного центра. Эта передача называется передачей *экситона.* Реакционный центр далее переходит в возбужденное состояние и запускает электронно-транспортную цепь.

У разных организмов электронно-транспортная цепь работает по-разному.

Фотосхема для растений

Фотосинтетическая электронно-транспортная цепь работает у растений.

У каждой фотосистемы есть максимум поглощения. Установлено, что фотосистема 1 поглощает свет длиной волны максимум 700 нанометров. Речь идет о реакционном центре фотосистемы. Когда туда доходит экситон, либо когда квант света поглощен антенной, которая находится в реакционном центре, она переходит в возбужденное состояние

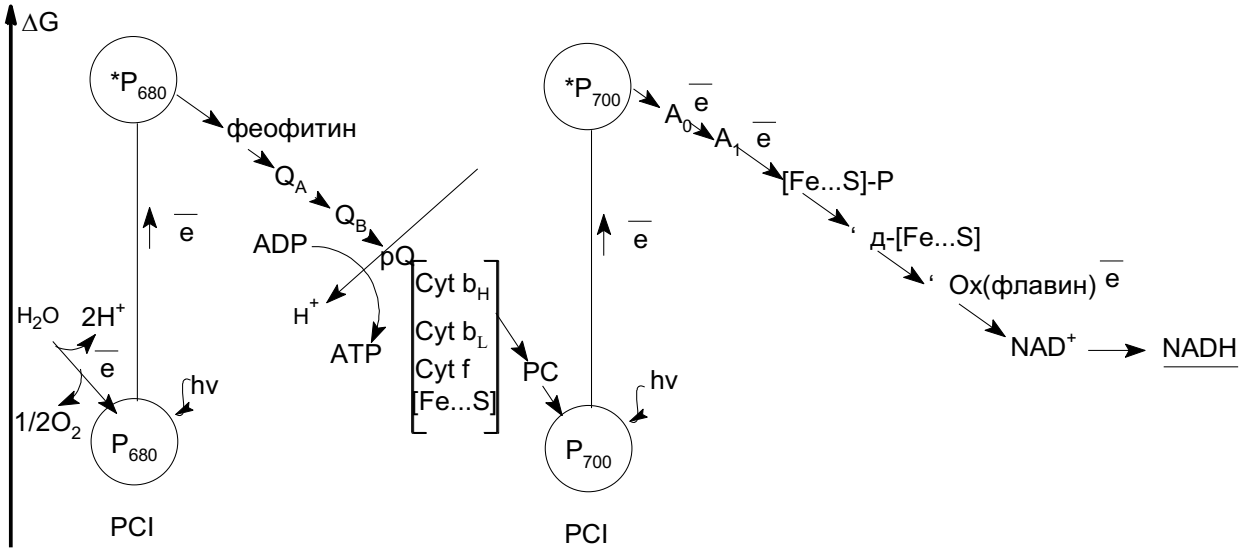


Рис 23. 1 Фотосхема для растений

Далее начинается процесс в электронно-транспортной цепи с убылью энергии**.** A_0 – хлорофилл. Далее A_1 – хинон. Затем набор железно-серных кластеров (PFES)n. Далее ферредоксин. Он тоже содержит железно-серные кластеры. Ферредоксин-оксидаза содержит флавин, и с флавина всё передается на $NADP^+$. $NADP^+$ превращается в NADPH. Получается высокоэнергетическое соединение. Нужен свет, и электрон

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

закидывается наверх. Идут окислительно-восстановительные процессы (окисление того, кто отдал, восстановление того, кто получил). Нужен электрон, чтобы его можно было передавать при получении кванта света. У растений для этого есть вторая фотосистема – фотосистема 2, P680, которая поглощает свет в более коротковолновой области. Поглотив квант света, она переходит в возбужденное состояние, и появляется ветка окислительно-восстановительных реакций, что приведет к фотосистеме 1. *Феофитин* – это хлорофилл без металла. Далее набор хинонов – Q_A, Q_B и pQ. Q_A, Q_B – монохиноны. У них есть одна карбонильная группа, которая может превращаться в гидроксильную.

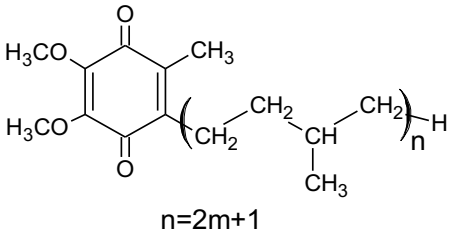


Рис 23.2 Общая формула пластохинона и убихинона.

В пластохиноне заместители проще, чем в убихиноне. Пластохинон выкачивает протоны. В фотосистеме 2 дальше расположен комплекс цитохромов, b_H, b_L, F и железно-серный комплекс. С выкачиванием протонов сопряжен синтез АТФ. На этой стадии АДФ и фосфат превращается в АТФ. АТФ-синтетаза такая же как в митохондриях, только смотрит во внутритилакоидное пространство. Между фотосистемой и комплексом есть пластоцианин PC – белок, содержащий атомы меди. С пластоцианина осуществляется закрытие «дырки» в фотосистеме 1. Молекула воды передает два электрона, выбрасывается в среду 2 протона, а также получается ½ молекулы кислорода. Чаще всего это называют H_2O разлагающим комплексом. Фотосистема в окисленном состоянии оказывается ниже. Это называется **Z схемой фотосинтеза.**

Потребности клетки в NADPH и АТФ не эквивалентны. АТФ нужно больше. В этом случае с ферредоксина идет передача электрона, и в результате синтезируется АТФ Процесс называется циклическое фотофосфорилирование.

Фотосхема для бактерий

У пурпурных бактерий фотосистема P 870 начинается с феофитина, дальше вступает хинон, который служит для выноса протонов, а затем система цитохромов – B, C1, C2 и возврат к невозбужденному состоянию. Синтезируют АТФ. Зелено-серные бактерии имеют P 840, имеют хлорофилл, хинон, затем есть два пути – либо система идет через образование цитохрома BC, цитохрома C553 и возврат, либо через

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ферредоксин-оксидазу, NAD^+ идёт до NADH. Бактерии умеют готовить оба варианта энергии – АТФ и NADH. У растений есть две фотосистемы, у бактерий одна.

Среди переносчиков есть: хлорофиллы, хиноны, белки с железно-серными кластерами, белки с медью, цитохромы, флавин содержащие ферредоксин оксидазу.

Как происходит фиксация CO_2. У растений это происходит в результате **C3** пути (он же цикл Кальвина).

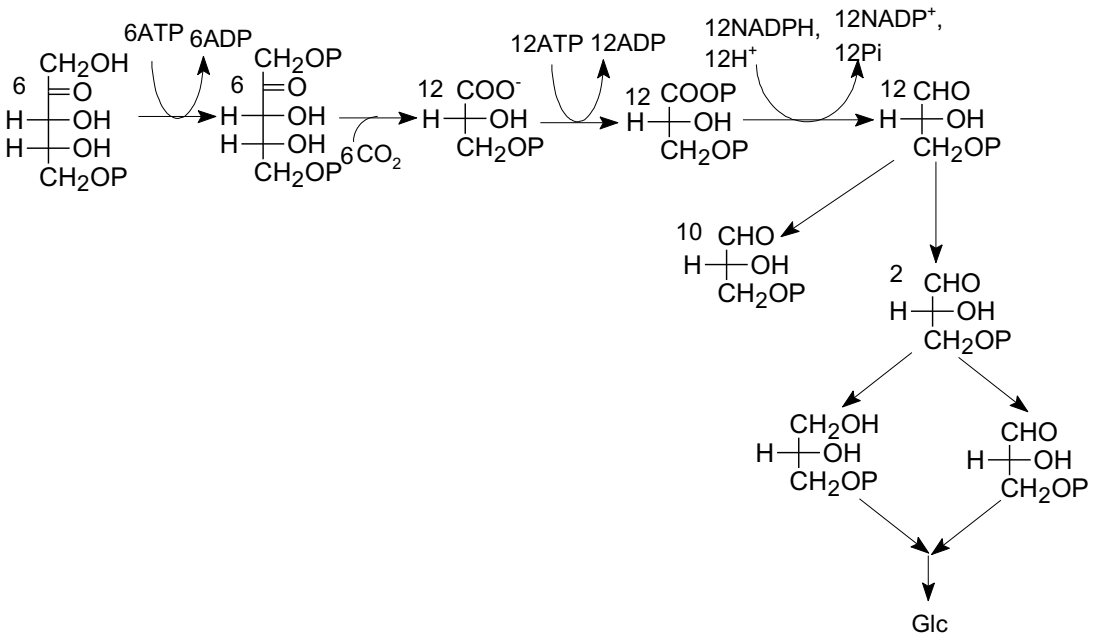


Рис 23.3 Фиксация CO_2

Цикл удобнее всего начинать с рибулозо-1,5-дифосфата. Из 6 атомов углерода можно будет сделать 1 глюкозу. В результате первой реакции образуется 12 эквивалентов три фосфоглицерата. Далее обращение гликолиза. 12 АТФ идут до 12 АДФ, получается 12 фосфоглицероилфосфатов. Далее нужно восстановить до 12 глицеральдегидов-2-фосфата, на это тратится 12 NADPH, 12 H^+. Получаем 12 $NADP^+$ и 12 неорганических фосфатов. Забираем три фосфоглицерата, и от них идем к глюкозе. 3 остается в виде ГАФ, 3 превращаются в дигидроксиацетонфосфат. Похоже на пентофосфотазный путь. Начинают работать трансальдолазы и транскетолаза. В результате приходит 6 молекул рибозо-5-фосфата. Чтобы замкнуть цикл, нужно фосфорилировать за счет АТФ. На 1 молекулу глюкозы тратится 12 эквивалентов NADPH и 18 эквивалентов АТФ. Оптимальней синтез идет при соотношении 3:2 АТФ к NADPH, что следует из цикла Кальвина. Ключевой фермент называется рибулозобифосфаткарбоксилаза – **рубиско**. Это фермент, при помощи которого

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

фиксируется CO_2. Обладает плохим сродством к CO_2, обладает сродством к другим газам (в частности к кислороду), как было сказано ранее.

Этот путь превалирует в умеренных широтах. В жаре не удается создать правильное парциальное давление CO_2, чтобы рубиско эффективно катализировало эту реакцию. Для этого существует путь **C4** или путь Хэтча Слэка. Есть фермент, обладающий большим сродством к CO_2 чем рубиско.

Клетка мезофилла смотрит наружу. У нее есть закрытые поры. Фермент – фосфоенолпируват. Фиксируется CO_2, никакое высокоэнергетическое соединение не синтезируется. Уходит Pi, и получается оксалоацетат. Далее в клетке обкладки протекает синтез, и здесь крутится цикл Кальвина. Оксалоацетат не проходит через мембрану, поэтому он восстанавливается до малата, и малат проходит. В результате еще одной ферментативной реакции под действием малатдекарбоксилазы CO_2 сдается в цикл Кальвина. Процесс идет с регенерацией NADPH. В результате получается пируват. Пируват возвращается, и цикл замыкается реакцией – входит АТФ и неорганический фосфат. Получается фосфоенолпируват и АМП и пирофосфат. Два киназных фосфорилирования протекают одновременно. Фермент – *дикиназа*. Ночью растения крутят цикл трикарбоновых кислот, CO_2 выделяется, и утром начинается фотосинтез. С нормальным фотосинтезом конкурирует процесс фотодыхание. Цель процесса (фотодыхания) неочевидна – в результате снижается эффективность биосинтеза, теряется до 1/3 биомассы.

Рибулозодифосфат под действием кислорода, превращается в 1 эквивалент 3-фосфоглицерата, и получается 5-ти углеродная молекула (фосфогликолат). CO_2 не фиксируется. С фосфогликолатом происходит гидролиз, уходит фосфат, остается гликолат, который в пероксисоме превращается в глиоксилат. Дальше идёт трансаминирование, получается глицин. Глицин проходит в митохондрию, и либо разлагается, либо встречается с тетрагидрофолатом, загруженным CO_2OH группой и получается серин. Серин трансаминируется α-Кетоглутарат глутаматом, и получается гидроксипируват. За счет NADH восстанавливается до три фосфоглицерата, за счет АТФ получается 3-фосфоглицерат. Этот процесс идет в митохондриях. Возможны ответвления на другие продукты. Возможно, это способ снабдить растения другими соединениями. Для растений углеводы – это главное: углеводы формируют клеточную стенку и являются запасным полисахаридом крахмалом.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 24

Витамины

Витамины – исключительно важные вещества, без них невозможна жизнь. В начале 20 века это был самый передний край науки, активно устанавливали строение витаминов, процессы, в которых витамины играют ключевую роль, налаживалось производство витаминов.

Витамины – вещества, которые организм не может синтезировать сам, но без которых не может жить. Он должен получать витамины либо с пищей, либо благодаря симбиозу с какими-либо организмами, бактериями. Витамины нельзя путать с веществами, которые играют схожую роль, т.н. факторы роста. С точки зрения химического состава, витамины – это разнородный класс. В данном случае понятие *класса* размыто.

Витамины можно разделить на две группы:

Водорастворимые	**Жирорастворимые**
Предшественники коферментов и кофакторов	Сложные механизмы

Водорастворимые витамины помогают работать ферментам, присутствуют в активном центре, являются наконечниками каталитического действия.

Витамины группы В

***B1* – тиамин**

Первый витамин, химическая структура которого была установлена, выяснилось, что это амин. «Витамин – это амин для жизни».

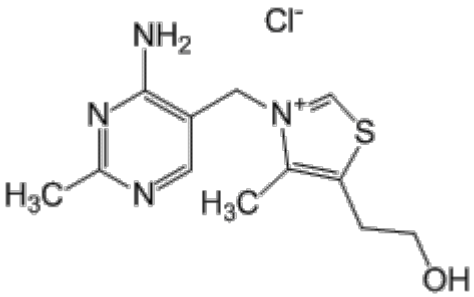


Рис 24.1 B1 – тиамин

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Кофакторная форма – тиаминпирофосфат (TPP). Участвует в разнообразных реакциях, встречался ранее в реакциях декарбоксилирования.

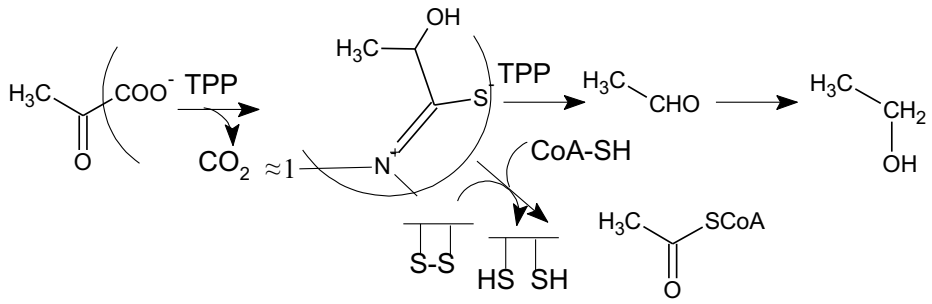


Рис 24.2 Примеры реакций с использование тиамина

Для его производного возможна стабилизация, резонансные формы. Гидроксиметильная производная (может быть другая). Самый крупнотоннажный процесс – пируват. Дальше возможны два пути. Если уходит молекула, регенерируется тиаминпирофосфат и получается альдегидная группа, получается карбонильный продукт. В случае, если декарбоксилирование окислительное, в пируватдегидрогеназном комплексе за счет липоевой кислоты восстанавливается, и получается ацилкофермент А.

Встречается в:

1. пируват дегидрогеназном комплексе (ферментом для тиаминпирофосфата является пируват дегидрогеназа (E1)
2. α-Кетоглутаратдегидрогеназном комплексе

***B2* – рибофлавин**

Состоит из флавина и рибита.

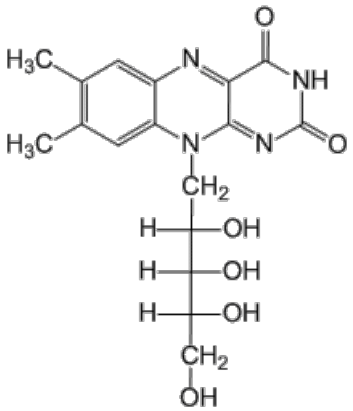


Рис 24.3 B2 – рибофлавин

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Продукт восстановления рибозы. Есть окисленная и восстановленная форма. Восстановленная форма принимает два атома водорода с органического субстрата.

Встречался в:

1. FAD → $FADH_2$ (сукцинатдегидрогеназа, создание двойных связей, окисление жирных кислот. От ацил-CoA в транс-еноил-CoA)
2. Флавинмононуклеотид по существу не является нуклеотидом. (NADH до гидрогеназы)
3. Флавобелки (фотосинтетическая электронно-транспортная цепь)

***PP* - никотинамид**

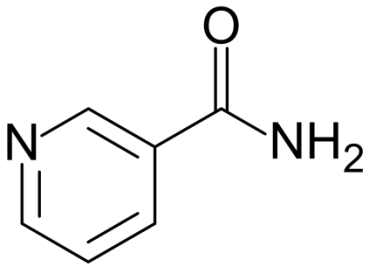


Рис 24.4 Никотинамид

Никотиновая кислота также рассматривается как витамин. В восстановленной форме с органического субстрата принимается только один водород в виде гидрид аниона, в отличие от рибофлавина.

Общая реакция: $AH_2 + NAD^+ \rightarrow A + NADH + H^+$.

Второй водород в виде протона уходит в среду. Реакция обычно обратима. Специализация – двухэлектронное окисление-восстановление. Например: окисление гидроксильной до карбонильной группы или восстановление карбонильной до карбоксильной, восстановление двойных связей. Пары: NAD^+/NADH, NADPH/$NADP^+$

В разных частях организма поддерживается различный окислительно-восстановительно потенциал. NAD^+ преимущественно локализуется в матриксе митохондрии. NAD^+ нужен в окисленной форме, чтобы окислять органическое топливо. Нужен в катаболизме. NADP – локализуется в цитозоле, анаболизм. Есть ферменты, готовые работать с NAD и NADP. (изоцитратдегидрогеназа). Это коферменты. Важно помнить, что это дегидрогеназы.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

***B5* – пантотеновая кислота**

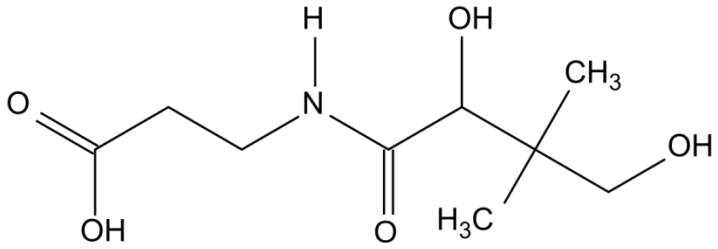


Рис 24.5 B5 – пантотеновая кислота

Встречалась в: *коферменте А*. Для образования кофермента А нехватает с одной стороны – пирофосфата, остатока рибозы с фосфорилированным три штрих положения и аденина, а с другой стороны еще одной амидной связи и остатока β-меркаптоэтаноламида. Кофермент А имеет такое название, потому что является переносчиком ацильных групп. Задействован в пируват дегидрогеназном комплексе, перенос жирных кислот через мембрану, синтез жирных кислот (маланил-CoA), перенос ацилов в различных процессах.

В синтезе жирных кислот задействовано еще одно производное пантотеновой кислоты – 4 фосфопантотеин. Синтез жирных кислот и ацил переносящий белок.

В начале 20 веке в Азии началась болезнь бери-бери. Выяснилось, что людям просто перестало хватать тиамина после перехода от нешелушеного риса к шелушёному. Благодаря этому начали изучать витамины.

***B6* – пиридоксин**

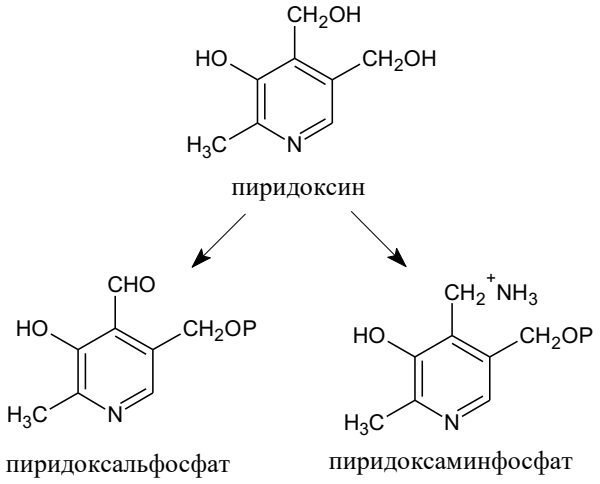


Рис 24.6 B6 – пиридоксин

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Имеет две формы – альдегидную и кофакторную (аминогруппа). Они участвуют в самых разных реакциях, активно работают с аминокислотами.

Встречалось в: трансаминировании. Реакция идет по основанию Шиффа. Самая важная реакция – α-KG + аминокислота = Glu + α-Кетокислота. Роль глутамата в метаболизме центральна. Он предшественник нейромедиатора в сворачивании крови, а также –главное хранилище азота.

***B12* – цианокобаламин**

Самый большой витамин.

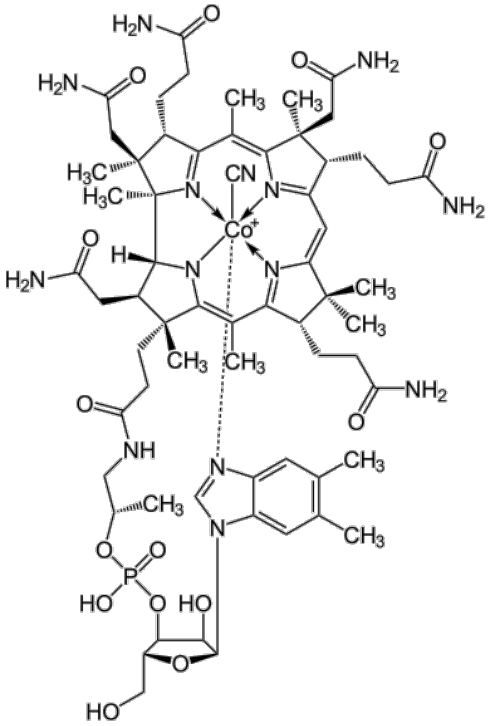


Рис 24.7 B12 – цианокобаламин

Кофакторная форма различается тем, что сверху уходит CN, а приходит α-рибоза.

Есть всего два случая, когда от АТФ уходят все фосфаты – S-аденозилметианин и в случае образования кофакторной формы B12.

Встречался в: превращение пропионил CoA в метилмалонил CoA, SAM

Вегетарианцы могут иметь проблемы с недостатком B12 спустя 3-5 лет после отказа от мяса.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Витамин С – L-аскорбиновая кислота

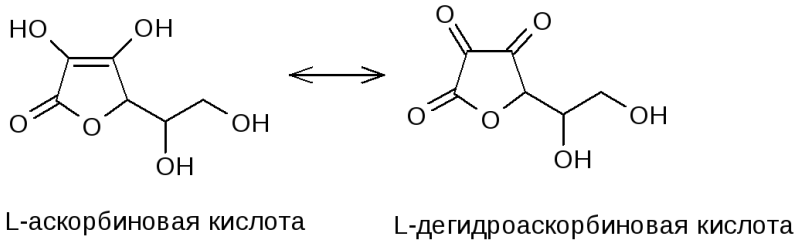


Рис 24.8 Резонансные формы L-аскорбиновой кислоты

Переходит из восстановленной формы в окисленную с большим количеством карбонильных групп и в таком виде выводится. Водорастворимый. Является антиоксидантом. Участвует в очень важных процессах, например, гидроксилировании пролина. Он превращает пролин в 4-гидроксипролин (Hyp). Также используется α-кетоглутарат. Это диоксигеназная реакция. Витамин С восстанавливает железо. Если кормить животных гидроксипролином, но не давать витамин С, то коллаген не будет иметь гидроксипролин. При недостатке витамина С бывает цинга.

***Витамин Р* – фолиевая кислота**

Имеет еще две формы – тетрагидрофолиевая кислота и дигидрофолиевая кислота, которая встречается гораздо реже. Фолиевая кислота – переносчик одноуглеродных групп (разных). Самая распространённая – CH_2OH.

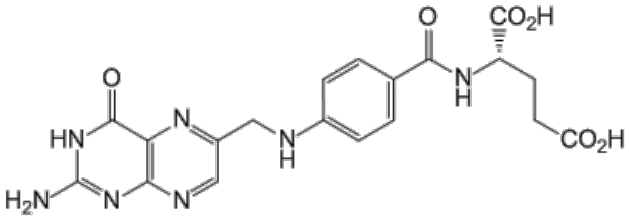


Рис 24.9 Витамин Р – фолиевая кислота

Не умеет носить карбоксильную группу.

Встречалось в реакции Ser ⇄ Gly ⇄ CO_2 + NH_4^+

Тетрагидрофолат задействован в обе стороны. Также он участвует в синтезе пуринов, гомоцистеине и метионине, U в T, превращение NDP в dNDP, который проходит на уровне дифосфатов (входит FH_4, выходит FH_2)

***Витамин Н* – биотин**

Это кофактор.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

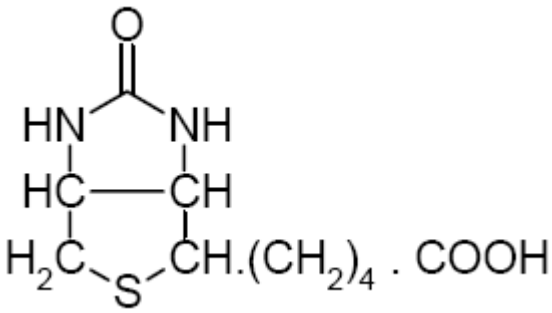


Рис 24.10 Витамин Н – биотин

К ε-аминогруппе лизины используются для того, чтобы ковалентно зацепить биотин, а с другой стороны становится CO_2, на это тратится энергия АТФ.

Участвует в анаплеротических реакциях, превращая пируват или фосфоенолпируват в оксалоацетат, ацетил-CoA в маланил-CoA, участвует в синтезе жирных кислот, превращает пропионил-CoA в диметиламиламин.

SAM – фактор роста

Участвует в процессах:

Синтеза из метионина и серина цистеина, гуанидинацетат преобразуется с помощью него в креатин, этаноламин – в холин, норадреналин – в адреналин.

Карнитин

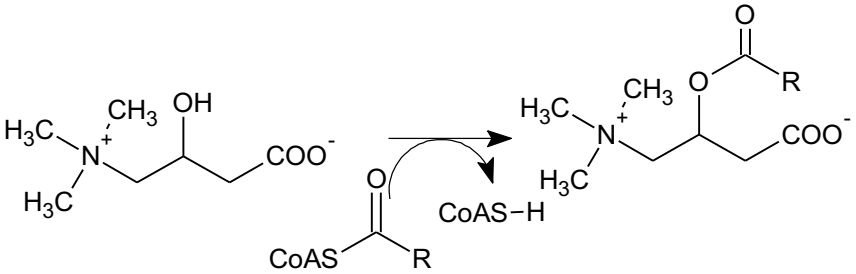
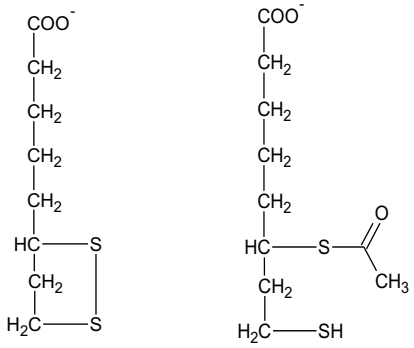


Рис 24.11 Ацилирование карнитина

За спиртовую группу цепляется жирная кислота с кофермента А. Уходит CoA и получается ацил карнитин. Чаще всего организмы могут синтезировать, но иногда нужно принимать дополнительно.

Липоевая кислота

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ



Ѣипоева€ кислота S-ацетил дигидролипоева€ кислота

Рис 24.12 Липоевая кислота и ее производная

Помимо окисленной формы существует еще две: ацетил (или в общем случае ацил). Ацил цепляется за 6-ой атом, и происходит окислительно-восстановительный процесс. Гидроксиметильная производная превращается в ацил, а липоевая кислота восстанавливается до дигидролипоевой. Еще одна форма – ацетил переходит на кофермент А, остается восстановленная липоевая кислота. Чтобы работал пируватдегидрогеназный комплекс или α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс, два водорода надо вернуть за счет FAD, а затем за счет NAD.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Лекция 25

Витамины и гормоны

Нерастворимые витамины: A, D, E, K. Они производные изопрена.

Витамин А – ретинол:

Провитамин А – каротин – является одним из пигментов для целей фотосинтеза.

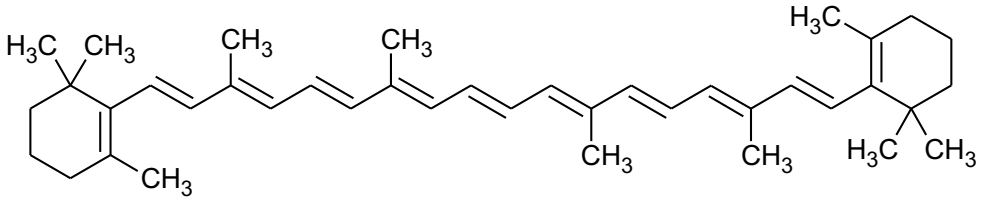


Рис 25.1 Провитамин А - каротин

Широко распространен в разнообразных растительных источниках, но также присутствует в некоторых эукариотах, например, рыбьем жире. Происходит разрыв и из одной молекулы в результате окислительного расщепления провитамина А получается две молекулы витамина А.

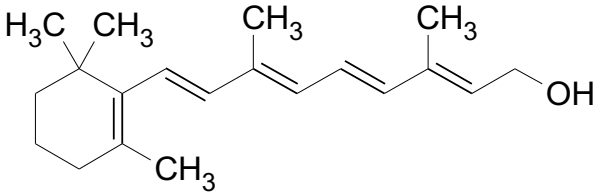


Рис 25.2 Витамин А – ретинол

Жирорастворимые витамины тоже зачастую являются предшественниками. Ретинол является предшественником двух разных вариантов: в любом случае происходи окисление и получается промежуточное соединение 11-цисретиналь:

Далее пути расходятся. В первом случае образуется комплекс с белком апсином и получается комплекс родопсин. В темноте содержит 11-цисретиналь, а на свету осуществляется переход в 11-транс, то есть тоже родопсин, но в результате ряда реакций ретиналь переходит в трансконфигурацию. Далее идет перестройка колбочек, и зрительный сигнал поступает в нервную систему. Таким образом производная витамина А задействована в зрении. В другую сторону идет окисление, и получается *ретионовая кислота.* Является гормоном. Регулятор образования кожных покровов и различных оболочек.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Прямых доказательств тому, что если есть много моркови, то будет хорошее зрение, нет.

Витамин D – кальциферол

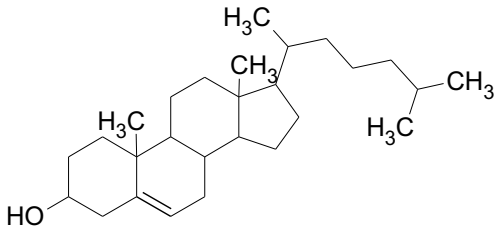


Рис 25.3 Витамин D– кальциферол

Получается из производного холестерина, из 7,8-дегидрохолестерин. На свету происходит разрыв связей.

В организме идет гидроксилирование, и уже это является гормоном D_3. Он регулирует усвоение кальция и фосфатов. Регулирует кальций, прежде всего, в костях. Недостаток этого витамина приводит к тому, что наблюдается рахит, а избыток ведет к образованию фосфатных камней в почках. Для поддержания организмом нужного количества витамина D в организме принимают рыбий жир, что, однако, без воздействия солнечного света на организм человека не сыграет должной роли.

D_2 – синтетический аналог, механизм действия аналогичен.

Витамин E – токоферол, неспецифический антиоксидант.

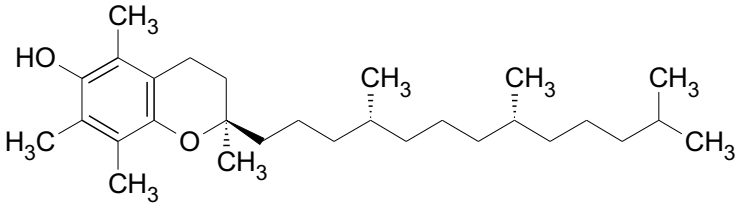


Рис 25.4 Витамин E – токоферол

В избытке присутствует в растительном масле. Антиоксидант. Защищает от активных форм кислорода. Защищает и лечит мембраны. Регулирует клеточную проницаемость.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

***Витамин К* – филлохинон**

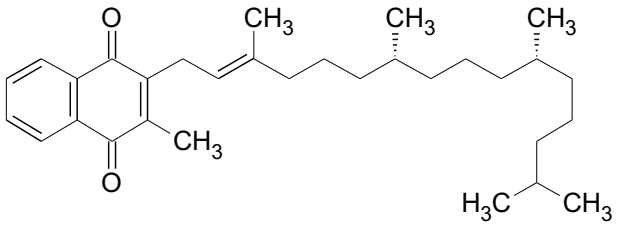


Рис 25.5 Витамин К – филлохинон

В первую очередь регулирует свёртывание крови по интересному механизму: крутится цикл, идет восстановление до семихинона, потом до фенола, а потом снова хиноидная структура. Параллельно с этим карбоксилируется глутаминовая кислота в белке протромбине (нужен кальций). Таким образом происходит активация тромбина, после чего из него торчат заряженные остатки $–CH_2-CH-(COO^-)_2$.Образуется γ-карбоксиглутаминовая кислота.

Из протромбина получается тромбин, и он из фибриногена делает фибрин, а фибрин – белок, образующий сгустки крови в местах порезов. Роль витамина К в этом случае колоссальна.

Иногда к витаминам относится убихинон и пластохиноны.

Таблица 25.1 Суточная норма потребления витаминов в рационе

Витамины	**Количество, мг**
A	2
D	0,025
E	5
K	4
C	75
B1	1
B2	1
B6	2
B12	0,02
PP(B3)	10
B5	5
H	0,3
P	1

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Гормоны

Мы изучили два способа регуляции в клеточном метаболизме: через ингибирование либо фосфорилирование/дефосфорилирование. В конечном счете, все регулируется гормонами. Гормоны – вещества, которые регулируют процессы в рамках целого организма или органов, но не в рамках клетки. В норме присутствуют в следовых количествах, но их количество может увеличиваться в ответ на изменение окружающей среды. Гормоны продуцируются органами одного типа, а ответ вызывают в других органах. Они секретируются внутрь, поэтому называются эндокринными.

Гормоны можно разделить на: **эндокринные** (когда гормон вырабатывается в органе и до ответа может пройти большое расстояние), **паракринные** (когда гормон вырабатывается клетками и распространяется наружу, но является сигналом для окружающих клеток) и **аутокринные** (вырабатываются и в самой же клетке вызывают ответ).

Гормоны бывают разного уровня. Иерархия эндокринной системы

Сигнал ЦНС передает в специальный отдел мозга, который называется гипоталамус, в ответ на это гипоталамус вырабатывает гормоны – вещества, которые передаются недалеко, в гипофиз, по специальным каналам. Большая часть дальше будет вырабатываться в передней доле (гипофиз передняя доля). Немного попадает и в заднюю долю, и в гипофиз. Гормоны, которые вырабатываются гипоталамусом, называются *либерины*. Это первичные гормоны. В ответ на попадание гипофиза начинают вырабатываться *тропины* – гормоны, вырабатываемые передней долей гипофиза. Они движутся ко вторичным мишеням – коре надпочечников. В ответ на пришедший кортикостероид организм начинает производить свои гормоны – конечные гормоны, которые движутся к конечным мишеням, где вызывают ответ. Кортикостероиды – это стероидные гормоны. Кортизол, альдостерон. Мишенью являются разные ткани. Стимулируют метаболизм.

Тирео – это щитовидная железа. Есть тиреоглобулин, который производит Т3 и Т4. Процесс идет так: тиреоглобулин в щитовидной железе содержит много остатков тирозина, и они там йодируются, и по мере необходимости отщепляются Т3 и Т4. Оказывают общее стимулирующее действие на метаболизм.

Предшественники половых гормонов: ФСГ и лактоглобулин (ЛГ). Влияют на лактацию.

Соматотропин – гормон роста. Влияет на скелет и на мышцы. Вырабатывается в передней доле гипофиза и идет сразу к конечным мишеням. Из ЦНС напрямую идет

мозговое вещество надпочечников, и оно вырабатывает адреналин без гипофиза. Адреналин в первую очередь влияет на печень, мышцы и сердце. Поджелудочная железа делится на два типа тканей: ткани, вырабатывающие множество разных ферментов протолитических и эндокринные ткани разных типов. Поджелудочная железа крайне важный орган для метаболизма. Эти эндокринные ткани реагируют на уровень глюкозы в крови и вырабатывают гормоны – либо инсулин (гормон, способствующий снижению уровню глюкозы), либо глюкагон (способствует повышению уровня глюкозы в крови). Регулирует их соотношение *соматостатин*. Задняя доля гипофиза без вторичных мишеней: производит окситоцин и вазопрессин. Окситоцин – стимулирует сокращение гладкой мускулатуры. Вазопрессин – регулирует артериальное давление.

NO – образуется из аргинина, легко проходит через мембраны и активирует гуанилатциклазу для производства циклического ГМФ.

Химические гормоны можно разделить на водорастворимые и жирорастворимые.

К водорастворимым относятся: либерины (короткие олигопептиды, от 3 до 15, первый либерин является 3 пептином), тропины (являются хорошими белками, 25-30 кДа молекулярная масса), амины (Т3, Т4 и адреналин), инсулин и глюкагон

К жирорастворимым относятся: стероидные гормоны кортико и половые гормоны. Гормоны взаимодействуют с рецептором.

Из химической природы гормонов следует два принципиально разных механизма действия.

1. Для водорастворимых Гормон связывается и выбрасывается вторичный посредник, так как гормон не может пройти через мембрану**.**

2. Для жирорастворимых: проходят внутрь, чаще всего попадают в ядро, здесь встречаются с рецептором, после этого связываются с ДНК и оказывают влияние на транскрипцию.

Часто цепочка регулируется по механизму обратной связи. Переизбыток конечных гормонов приходится к тому, что подавляется производство либеринов и тропинов. Это справедливо для множества цепочек. Простые с точки зрения строения гормоны производятся быстро, а другие хранятся в неактивной форме (пример: инсулин).

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Адреналин

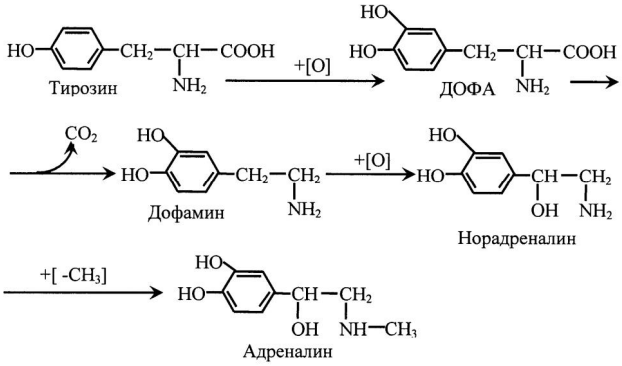


Рис 25.6 Синтез адреналина

Тирозин гидроксилируется и получается диоксифенилаланин (дофа).

Затем уходит CO_2 группы и остается дофамин, который тоже обладает гормональными свойствами. Далее он гидроксилируется и получается норадреналин, который тоже обладает гормональными свойствами. И затем идёт метилирование по азоту, в результате чего получается адреналин (типичный амин).

Рецептор адреналина 7 раз пересекает мембрану. Рядом с рецептором адреналина находится G- белок. Содержит α, β и γ субъединицу, и в норме в неактивном состоянии с α субъединицей связан ГДФ, а в данном случае происходит замена ГДФ на ГТФ при попадании адреналина. Как только происходит замена, диссоциирует α субъединица, а рядом есть фермент ацетиладенилатциклаза, и к нему приходит α субъединица с ГТФ. АЦ из молекулы АТФ делает вторичный посредник – циклический АМФ

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

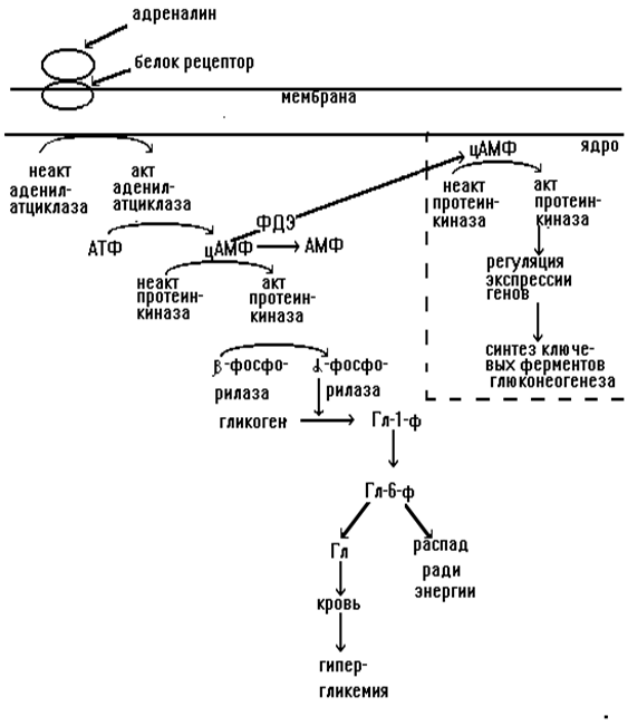


Рис 25.7 Механизм действия адреналина

Далее ЦМФ связывается с находящимся неподалеку ферментом протеин киназой. Каталитические субъединицы расходятся и переходят в активное состояние. Они за счет АТФ берут неактивную киназу фосфорилазы и фосфорилируют, переводят в активную киназу фосфорилазы и АДФ. Уже активная киназа встречается с гликогенфосфорилазой Б, и под действием активной киназы фосфорилазы получается гликоген фосфорилаза А активная и АДФ. Гликоген забирает гликоген фосфорилазу А и превращает в гликоген n-1 и глюкозо-1-фосфат. Далее начинается гликолиз.

Адреналин в печени и мышцах стимулирует гликолиз, повышает давление и готовит сердечную мышцу к активной работе. Это называется адреналиновым каскадом. Концентрация адреналина возрастает на четыре порядка.

Гликоген не может одновременно расщепляться и синтезироваться. После уменьшения сильного стресса фосфодиэстераза превращает ЦАМФ в АМФ, фосфатаза дефосфорилирует ферменты, уменьшается концентрация ЦАМФ, и протеин киназа деактивируется.

Кофеин и теофиллин пролонгируют действие адреналина, ингибируют фосфодиэстеразу.

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

Приложение

Таблица названий и обозначений аминокислот

A	Ala	Alanine	Аланин
R	Arg	Arginine	Аргинин
N	Asn	Asparagine	Аспарагин
D	Asp	Aspartic Acid	Аспарагиновая кислота
C	Cys	Cysteine	Цистеин
Q	Gln	Glutamine	Глутамин
E	Glu	Glutamic Acid	Глутаминовая кислота
G	Gly	Glycine	Глицин
H	His	Histidine	Гистидин
I	Ile	Isoleucine	Изолейцин
L	Leu	Leucine	Лейцин
K	Lys	Lysine	Лизин
M	Met	Methionine	Метионин
F	Phe	Phenylalanine	Фенилаланин
P	Pro	Proline	Пролин
S	Ser	Serine	Серин
T	Thr	Threonine	Треонин
W	Trp	Tryptophan	Триптофан
Y	Tyr	Tyrosine	Тирозин
V	Val	Valine	Валин

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ МГУ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ФОНД ВОЛЬНОЕ ДЕЛО
teach-in ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ХИМИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ