



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](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
ВЫПУСКНИЦУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ
ШАПОВАЛОВУ ТАТЬЯНУ ДМИТРИЕВНУ



Оглавление

Лекция 1. Метаболизм. Биокатализ. Гликолиз.....	7
Метаболизм.....	7
Биокатализ.....	8
Биохимическое дыхание.....	10
Высокоэнергетические соединения.....	11
Гликолиз.....	13
Лекция 2. Энергетика и регуляция гликолиза.....	16
Энергетика гликолиза.....	16
Роль фосфорилирования промежуточных продуктов.....	16
Регуляторные стадии гликолиза.....	18
Брожение.....	18
Задача на механизм ретроальдолевой конденсации.....	19
Лекция 3. Унификация топлива. ЦТК.....	20
Альтернативные субстраты для гликолиза.....	20
Пируватдегидрогеназный комплекс.....	24
Цикл трикарбоновых кислот.....	27
Лекция 4. ЦТК: энергетика и регуляция.....	30
Физиологический смысл ЦТК.....	30
Энергетика ЦТК.....	30
Принцип работы ферментов.....	31
Регуляция ЦТК.....	32
Анаплеротические реакции.....	33
Пути атомов в ЦТК.....	34
Лекция 5. Цитология. ЭТЦ.....	37
Цитология. Прокариоты и эукариоты.....	37
Глиоксилатный цикл.....	41
ЭТЦ.....	43
Энергетика ЭТЦ. Синтез АТР.....	46
Лекция 6. Q-цикл. Челночные системы.....	49
Q-цикл.....	49
Баланс по АТР, АDР и Р _i	50
Регуляция Q-цикла.....	51
Локализация процессов в клетке.....	52
Челночные системы для переноса NADH.....	52

Лекция 7. Пентозофосфатный путь	56
Окислительный этап	56
Неокислительный этап.....	57
Путь Энтнера-Дудорова	60
Синтез витамина С	61
Лекция 8. Катаболизм жирных кислот	64
Расщепление, активация и транспорт жиров.....	64
β -Окисление жирных кислот.....	67
Катаболизм жирных кислот с нечётным числом атомов углерода	69
Витамин/кофермент B_{12}	70
Лекция 9. Катаболизм жирных кислот	74
β -Окисление в пероксисомах/глиоксисомах	74
Окисление непредельных жирных кислот.....	75
α -Окисление жирных кислот с разветвлённой цепью	78
ω -Окисление жирных кислот в ЭПР	79
Лекция 10. Кетоновые тела. Биосинтез жирных кислот	81
Кетоновые тела.....	81
Биосинтез жирных кислот	83
Синтаза жирных кислот.....	85
Механизм биосинтеза жирных кислот	86
Лекция 11. Регуляция синтеза жк. Синтез ацилглицеридов	91
Челночная система для переноса ацетил-СoА	91
Регуляция биосинтеза жирных кислот.....	92
Синтез триацилглицеринов	93
Синтез диацилглицеринов.....	96
Синтез стероидов.....	99
Лекция 12. Катаболизм аминокислот. Выведение азота	101
Условия метаболизма аминокислот	101
Выведение азота из организма.....	101
Удаление аминогруппы. Трансаминирование.....	102
Окислительное дезаминирование.....	104
Способы транспорта аммиака	105
Глюкозо-аланиновый цикл.....	106
Синтез мочевины (орнитинный цикл).....	107
Взаимосвязь ЦТК и цикла мочевины	110

Лекция 13. Деградация углеродного скелета.....	112
Пути деградации углеродного скелета аминокислот	112
Одноуглеродные переносчики	113
Катаболизм простейших аминокислот.....	116
Катаболизм фенилаланина и тирозина.....	117
Лекция 14. Анаболизм аминокислот	120
Круговорот азота в биосфере	120
Процесс анаммокс	121
Анаболизм аминокислот. Биосинтез глутамата и глутамина	123
Биосинтез заменимых аминокислот	124
Лекция 15. Глюконеогенез.....	129
Гликолиз и глюконеогенез. Общие стадии.....	129
Первый обходной путь – превращение пирувата в фосфоенолпируват	130
Второй вариант первого обходного пути (через лактат).....	133
Второй обходной путь – превращение фруктозо-1,6-бисфосфата во фруктозо-6-фосфат	134
Третий обходной путь – образование глюкозы из глюкозо-6-фосфата.....	135
Метаболизм гликогена.....	136
Согласованная регуляция синтеза и распада гликогена.....	139
Синтез гликогена <i>de novo</i>	140
Два типа гексокиназы	142
Лекция 16. Фотосинтез. Световая фаза	143
Круговорот углерода. Автотрофные фотосинтетики	143
Световая и темновая фазы фотосинтеза.....	145
Хлоропласты и светопоглощающие пигменты	146
Поглощение света фотосистемой. Путь экситонов в хлоропластах	149
Фотохимическая система типа II (феофитин-хиноновая) у пурпурных бактерий	150
Фотохимическая система типа I (Fe-S-система) у зелёных серных бактерий	152
Лекция 17. Реакции ассимиляции. Цикл Кальвина	153
Взаимодействие двух фотосистем у растений	153
Особенности фотосинтеза галофитных бактерий.....	156
Темновые стадии. Фиксация CO ₂	158
Фермент рубиско	159
Цикл Кальвина.....	160
Пластиды.....	163
Пути превращения синтезированных триозофосфатов.....	164

Лекция 18. Фотодыхание. C4- и САМ-пути.....	166
Фотодыхание	166
C4-путь, или путь Хэтча-Слэка	168
САМ-путь.....	171
Лекция 19. Метаболизм пуринов	172
Катаболизм пуринов	172
Растворимость мочевой кислоты.....	174
Реутилизация пуринов	175
Синтез пуринов <i>de novo</i>	175
Регуляция биосинтеза пуриновых нуклеотидов.....	179
Лекция 20. Метаболизм пиримидинов.....	181
Синтез трифосфатов.....	181
Синтез пиримидинов.....	181
Синтез дезоксирибонуклеотидов.....	183
Механизм катализа рибонуклеотидредуктазой.....	184
Лекция 21. Катаболизм пиримидинов. Гормоны	187
Биосинтез тимидилата (dTMP)	187
Катаболизм пиримидинов	189
Эндокринная система, железы и их гормоны.....	189
Классификация гормонов	191
Адреналин и норадреналин	193

Лекция 1. Метаболизм. Биокатализ. Гликолиз

Метаболизм

Метаболизм – это совокупность всех химических процессов, протекающих в организме.

- **катаболизм** – это процесс метаболического распада сложных веществ на более простые
- **анаболизм** – это процесс биосинтеза сложных веществ из более простых

Эти два процесса разнонаправлены и взаимосвязаны. Катаболизм поставляет в анаболизм строительные блоки и энергию, которая запасается в виде АТФ (рис. 1.1).

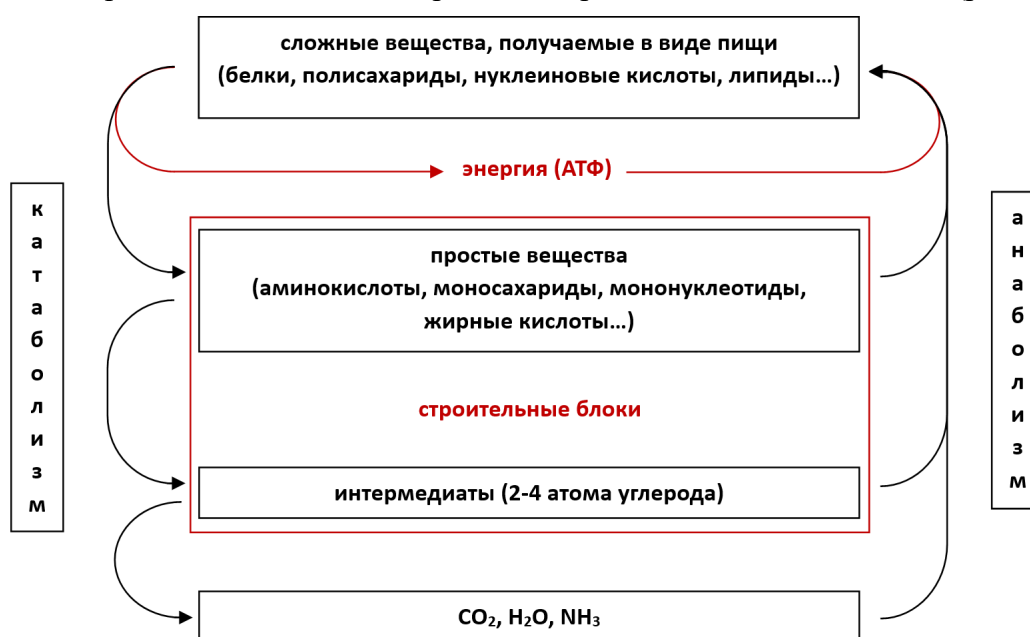


Рис. 1.1. Схема метаболизма

Отличительные особенности живых существ:

1. Наличие постоянство генетической информации
2. Воспроизводство
3. Матричный синтез сложных биомолекул (процессы репликации, транскрипции, трансляции)
4. Ограниченное количество классов соединений
5. Огромное разнообразие молекул внутри классов
6. Построение сложных молекул с разными свойствами путём комбинации ограниченного набора простых строительных блоков
7. Продвинутая организация систем
8. Высокие скорости химических реакций (ферментативный катализ, поскольку подавляющее большинство процессов, протекающих в организме, являются ферментативными)

9. Гомеостаз (способность открытой системы сохранять постоянство состава внутренней среды)

10. Компарментализация (биохимические процессы в клетке локализованы в определённых отсеках (компартаментах), отделённых друг от друга билипидной мембраной)

Виды метаболизма:

- первичный – это основные процессы, которые идут практически в неизменном виде во всех организмах и клетках с древних времён. Это самые «крупнотоннажные» и наиболее изученные процессы.
- вторичный – это уникальные очень важные процессы, которые необходимы для жизнедеятельности конкретного организма
- «полутонный» – например, процессы синтеза и расщепления аминокислот очень по-разному протекают в различных организмах. Большое количество аминокислот и различие путей свидетельствуют о том, что это уже не первичный метаболизм. Тем не менее, продукты данных метаболических путей важны для всех живых организмов на Земле. Ещё один пример – синтез витамина С.

Особенности метаболизма:

- включает в себя огромное количество взаимосвязанных химических реакций
- в метаболизме практически нет конечных продуктов. Даже кислород, углекислый газ и вода могут являться продуктами или субстратами реакций, протекающих в организме
- есть множество путей; основные детально изучены

Биокатализ

Абсолютное большинство метаболических процессов являются биокаталитическими. Их скорость определяется скоростью ферментативной реакции, которая в свою очередь подвергается очень тонкой регуляции. Это особенность всех процессов, протекающих в живой материи. Организмы построены очень экономно, энергия не расходуется впустую.

Скорость реакции можно регулировать, изменяя следующие параметры:

1. концентрация фермента

- транскрипция соответствующих генов с использованием транскрипционных факторов
- соотношение скоростей транскрипции и деградации мРНК (подавление активности РНКазы)
- мРНК трансляция на рибосомах
- соотношение скоростей трансляции и биodeградации белков

- хранение ферментов в клеточных органеллах (депо), например, в ЭПР, где идёт посттрансляционная модификация
 - хранение в депо про-ферментов
2. концентрация субстрата (поставка веществ по градиенту и против градиента)
 3. каталитическая активность фермента (активаторы и ингибиторы ферментов)

Регуляция каталитической активности может происходить по механизму обратной связи. Суть заключается в том, что непосредственный продукт ферментативной реакции или продукт последующих реакций накапливается в избытке и выступает ингибитором фермента, который катализирует данную реакцию. Например, при гликолизе образуется переизбыток АТФ, в результате чего выключается путь получения энергии и включается путь её запасаения. Чаще блоком выступает непосредственный продукт или продукт следующей стадии. Для этого у ферментов есть центры связывания.

Ферменты в равной мере ускоряют прямую и обратную реакцию, но не влияют на положения равновесия. Когда все стадии обратимо катализируются одними и теми же ферментами, невозможно ускорить катаболический путь или затормозить анаболический. Или оба ускоряется, или оба замедляются, а это нерационально. В данном процессе может быть сколько угодно одинаковых стадий, но как минимум одна должна идти по другому пути и катализироваться другим ферментом. В случае гликолиза и глюконеогенеза таких стадий 3 (из 10). Оба эти процесса идут с суммарным уменьшением ΔG .

Аллостерическая регуляция – это регуляция фермента путём связывания эффекторной молекулы в сайте, отличном от активного сайта фермента. Присоединение к аллостерическому центру активатора или ингибитора изменяет конформацию молекулы фермента и, соответственно, конфигурацию активного центра. Это приводит к изменению сродства фермента к субстрату и вызывает повышение или понижение активности фермента:

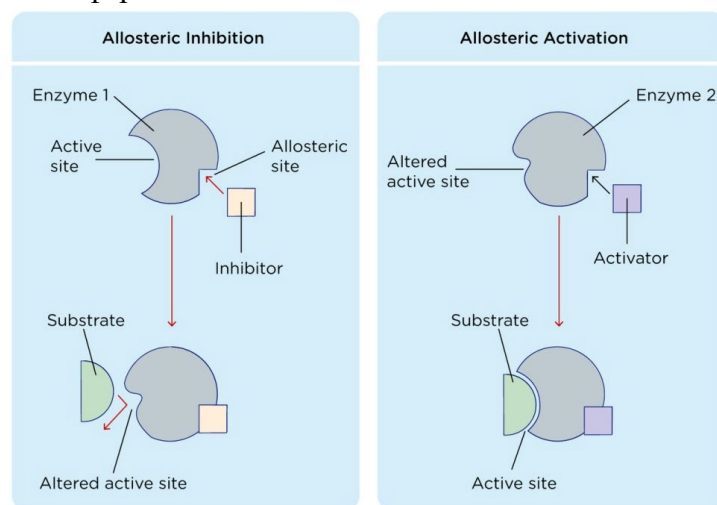


Рис. 1.2. Аллостерическая регуляция активности фермента

Биохимическое дыхание

Биохимическое дыхание – это окисление органического топлива за счёт кислорода воздуха.

Круговорот углерода

По способности фиксировать углерод (рис. 1.3) организмы делятся на автотрофов (растения, бактерии, цианобактерии) и гетеротрофов (животные). Автотрофы, в отличие от гетеротрофов, способны к фотосинтезу. Из CO_2 и H_2O они способны производить органические молекулы. Побочный процесс – образование кислорода. Движущая сила – солнечный свет. Поедая растения или других животных, гетеротрофы получают углерод из органических веществ путём их окисления кислородом.

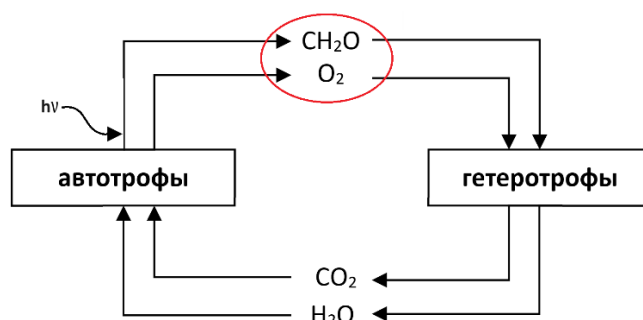


Рис. 1.3. Круговорот углерода в биосфере

В качестве отправной точки возьмём глюкозу. Рассмотрим простейшую не ферментативную реакцию: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} + Q$. Чтобы её запустить, необходимо преодолеть энергию активации.

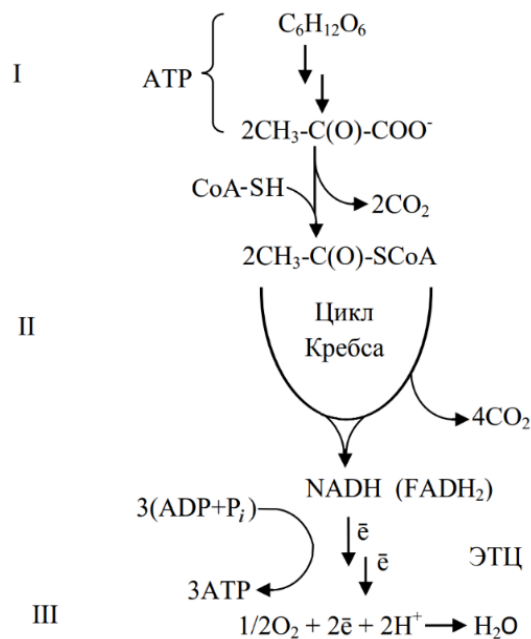


Рис. 1.4. Схема биохимического дыхания

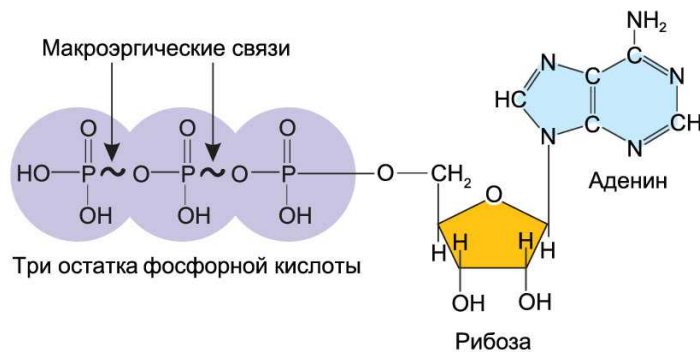
В организме протекает тот же процесс, только гораздо сложнее. Он происходит другими путями и с участием ферментов. Процесс длительный, однако это позволяет не потерять энергию, а большую часть запастись в виде АТФ. 1 молекула NADH может дать максимум 2,5 эквивалента АТФ, а FADH₂ – 1,5 АТФ.

Биохимическое дыхание происходит в 3 этапа (рис. 1.4):

- гликолиз (подготовительный этап, окисление ещё не началось)
- цикл Кребса (или ЦТК – цикл трикарбоновых кислот)
- электрон-транспортная цепь (ЭТЦ)

Высокоэнергетические соединения

1 молекула NADH может дать максимум 2,5 эквивалента АТФ, а FADH₂ → 1,5АТФ. АТФ несёт суммарный заряд 4⁻ и имеет две макроэргических связи (рис. 1.5). Помимо этого к высокоэнергетическим соединениям относят GTP, CTP, UTP, эфиры CoA, креатин-фосфат, а также промежуточные продукты гликолиза: фосфоглицерилфосфат (PGP) и фосфоенолпируват (PEPvt) (P = -PO₃²⁻).



гидролиз АТФ:



$$\Delta G^{0'} = -7,3 \text{ ккал/моль}$$

Рис. 1.5. Структура молекулы АТФ

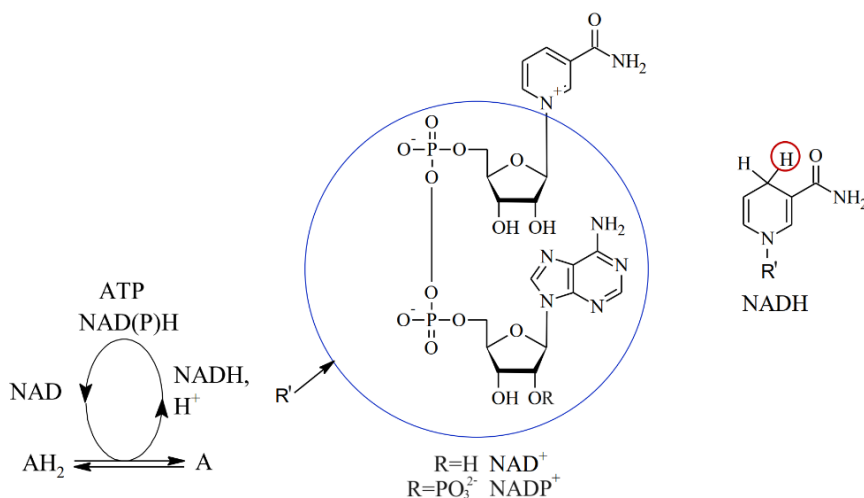


Рис. 1.6. Структура молекул NADH и NAD(P)H

В организме часто происходят окислительно-восстановительные реакции (ОВР), катализируемые ферментом оксидоредуктазой. Есть 2 базовых типа окислительных процессов: оксигеназный (включается один или несколько атомов кислорода) и дегидрогеназный (уходят 2 атома водорода). На рис. 1.6 представлена дегидрогеназная реакция восстановления NAD^+ до NADH , в которой AH_2 отдаёт H_2 , в результате чего получается дегидрированный органический субстрат А. Реакция обычно обратима. NADP специализируется по анаболическим процессам, а NAD – по катаболическим.

Никотинамид является витамином РР, а никотиновая кислота – это витамин В3.

Коферменты имеют собственный центр посадки. Они садятся на ферментативную глобулу, претерпевают изменения, уходят и ищут сопряжённый процесс. **Кофакторы** прочно связаны с конкретной белковой глобулой, находятся в активном центре и сами уйти с глобулы не могут. То есть кофакторы прочно связаны с ферментом, а коферменты – непрочно.

NAD и NADP – это коферменты. FAD – это кофактор, производное рибофлавина (рис. 1.7). FAD прочно связан с белковой глобулой. NAD забирает гидрид-анион и выбрасывает протон в среду. FAD забирает оба протона и оба электрона. Чаще используется NAD . Он специализируется на окислении-восстановлении полярных связей (спирты \rightarrow альдегиды/кетоны, альдегиды \rightarrow карбоновые кислоты), а FAD в основном специализируется по неполярным связям (изъятие водорода и образование двойной связи).

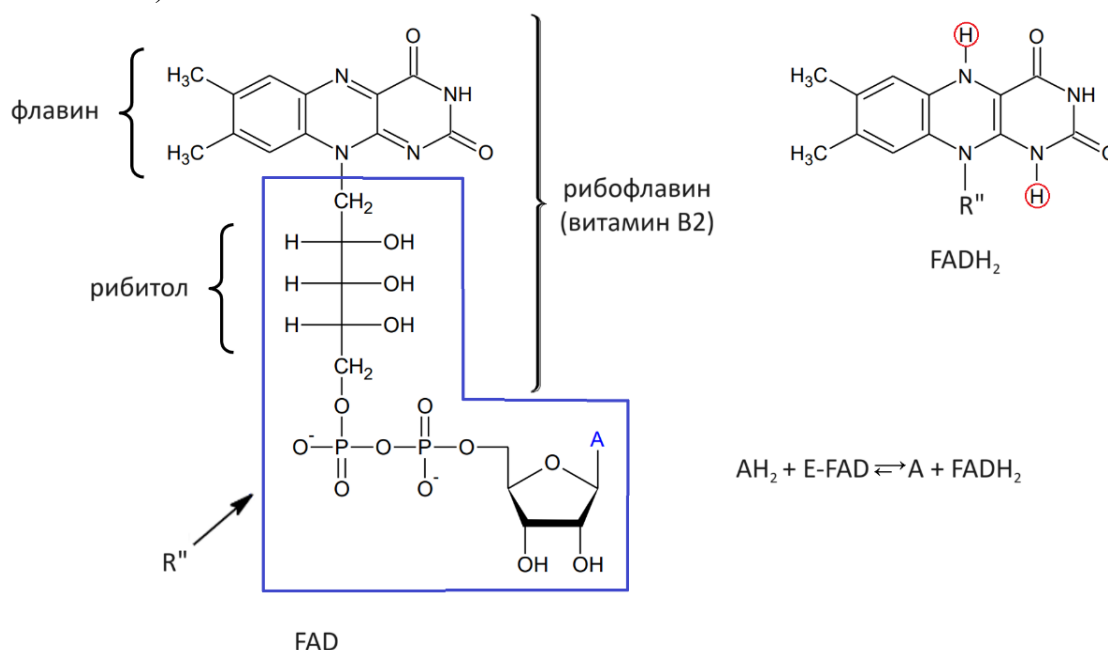


Рис. 1.7. Структура молекулы FAD.

Кофермент А состоит из 3-х блоков (рис. 1.8): P -ADP, остаток витамина В5 (пантотеновой кислоты) и остаток β -меркаптоэтаноламина.

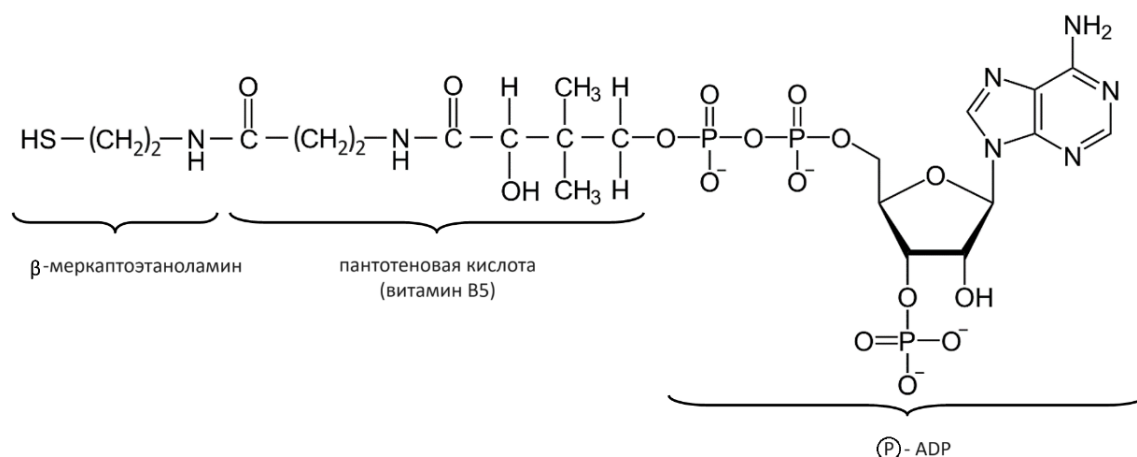


Рис. 1.8. Структура молекулы кофермента А

Если прометилировать гуанидиновую группировку гуанидинацетата, то получится креатинфосфат (рис. 1.9). Это депо энергии в мышцах. Как только в клетке падает концентрация АТФ, то в качестве источника для пополнения АТФ используется креатинфосфат (фосфатная группа передаётся с креатина на АДФ).

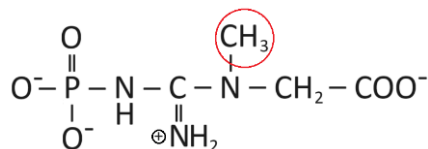


Рис. 1.9. Структура креатинфосфата

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 не принципиально.

Животные различаются по способности к анаэробному гликолизу. Он характерен в случае необходимости спринтерского усилия (100-200 метров, рывок штанги). Способность к кислородному перевариванию всех запасов до CO₂ и H₂O – 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 усталости долго, так же как и перелетные птицы (у них тёмное и жёсткое мясо).

Гликолиз

В процессе гликолиза происходит последовательное ферментативное расщепление молекулы глюкозы с образованием двух молекул трёхуглеродного соединения пирувата. Часть высвобождающейся в этом процессе свободной энергии

запасается в виде АТФ и NADH. Гликолиз – практически универсальный центральный путь катаболизма глюкозы. В большинстве клеток в этом процессе происходит превращение основных количеств углеродсодержащих соединений.

Расщепление шестиуглеродной глюкозы на две молекулы трёхуглеродного пирувата представляет собой последовательность из 10 реакций, из которых первые пять называют подготовительной стадией.

Первый этап (рис. 1.10):

1. Первая запусковая реакция необратима, тратится 1 макроэргическая связь. Глюкоза (Glc) подвергается фосфорилированию за счёт АТФ по шестому положению. Это положение самое свободное и доступное, туда переносится фосфатная группа с АТФ. Эта реакция протекает с сильным падением свободной энергии. Регуляторным ферментом E1 является **гексокиназа**. Это фермент из подкласса трансфераз. Фосфорилирование за счёт высокоэнергетического соединения называется киназной реакцией.

2. Обратимая изомеризация: глюкозо-6-фосфат (Glc-6-Ⓟ) превращается во фруктозо-6-фосфат (Fru-6-Ⓟ). Фермент E2 – глюкозофосфатизомераза (**фосфоглюкоизомераза**).

3. Вторая запусковая реакция – тратится ещё одна молекула АТФ. Получается дважды фосфорилированное соединение фруктозо-1,6-бифосфат (Fru-1,6-ⓅⓅ). Бифосфат – две фосфатные группы в разных частях молекулы, дифосфат – две фосфатные группы подряд, как в АДФ. Реакция необратима. Фермент E3 – **фосфофруктокиназа (ФФК)**.

4. Обратимая ретроальдольная конденсация, в результате которой рвётся связь С-С с образованием двух продуктов: дигидроксиацетонфосфат (DHAⓅ) и глицеральдегидфосфат (GAⓅ). Фермент E4 – **альдолаза**.

5. В гликолизе может использоваться только глицеральдегидфосфат, но организм не может терять половину атомов углерода, поэтому идёт альдо-кето изомеризация. Фермент E5 – **триозофосфатизомераза**.

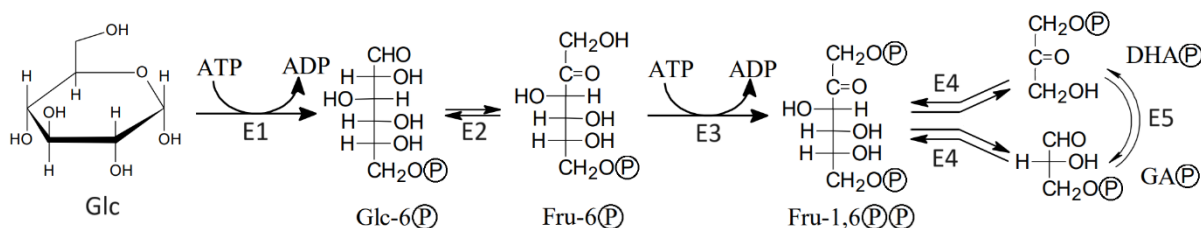


Рис. 1.10. Первый этап гликолиза

На этом заканчивается первый этап инвестиций. Вложили 2 макроэргические связи АТФ и в результате получили 2 трёхуглеродных фрагмента, активированных фосфатной группой.

Вторая (возвратная) стадия гликолиза (стадия «выплаты процентов») сопровождается высвобождением энергии.

Второй этап (рис. 1.11):

6. Две молекулы глицеральдегидфосфата ($\text{GA}(\text{P})$) подвергаются окислительно-восстановительным реакциям. Карбонильная группа окисляется до карбоксильной, NAD^+ до NADH и протона. Входит неорганический фосфат, в качестве продукта образуется два эквивалента фосфоглицероилфосфата ($\text{P}(\text{G}(\text{P}))$) – смешанного ангидрида фосфоглицериновой и фосфорной кислот. Он относится к сверхвысокоэнергетическим соединениям. Реакция обратима. Фермент E6 – **глицеральдегидфосфатдегидрогеназа** (ГАФД или $\text{GA}(\text{P}(\text{DH}))$).

7. Гидролиз приводит к тому, что из двух молекул АДФ получается две молекулы АТФ, а в качестве органического продукта остаётся 3-фосфоглицерат ($3\text{-P}(\text{G})$). Реакция обратима. Фермент E7 – **фосфоглицераткиназа**.

8. Реакция внутримолекулярного переноса фосфатной группы из третьего положения во второе. Из 3-фосфоглицерата получается 2-фосфоглицерат ($2\text{-P}(\text{G})$). Реакция обратима. Фермент E8 – **фосфоглицератмутаза**. Реакции с переносом группы внутри молекулы называются мутазными, а с переносом группы между двумя молекулами – трансферазными (частные случаи реакции изомеризации).

9. Обратимая дегидратация. В результате происходит потеря молекулы воды, получается ещё одно сверхвысокоэнергетическое соединение – фосфоенолпируват ($\text{P}(\text{EPvt})$). Фермент E9 – **фосфоглицератдегидратаза**.

10. Фосфатная группа с фосфоенолпирувата переносится на АДФ с образованием АТФ и пирувата (Pvt). Фермент E10 – **пируваткиназа**.

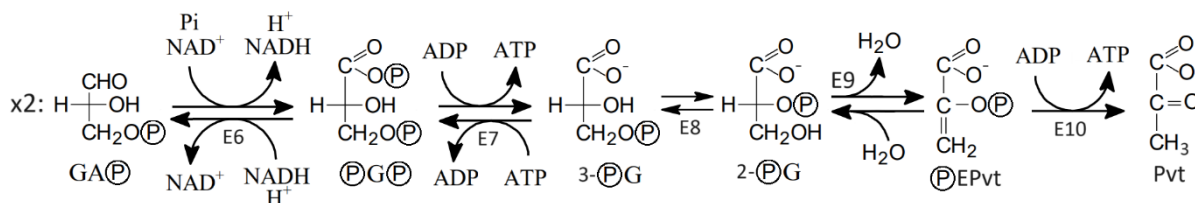


Рис. 1.11. Второй этап гликолиза

Весь процесс гликолиза необратим. Исходное (глюкоза) и конечное (пируват) соединения не фосфорилированы. Все промежуточные соединения гликолиза фосфорилированы. На этапе «инвестиций» тратятся две молекулы АТФ, а на этапе «получения дивидендов» возвращаются 4 молекулы. Таким образом, энергетический результат гликолиза: +2 молекулы АТФ.

Лекция 2. Энергетика и регуляция гликолиза

Энергетика гликолиза

1. Первая запусковая стадия, используется АТФ, значительное падение энергии
 $\text{Glc} \rightarrow \text{Glc-6(P)}. \Delta G = -4 \text{ ккал/моль}$
2. $\text{Glc-6(P)} \rightleftharpoons \text{Fru-6(P)}. \Delta G = +0,5 \text{ ккал/моль}$
3. Вторая запусковая стадия, используется АТФ, значительное падение энергии
 $\text{Fru-6(P)} \rightleftharpoons \text{Fru-1,6(P(P))}. \Delta G = -3,5 \text{ ккал/моль}$
4. Обратимая ретроальдольная конденсация
 $\text{Fru-1,6(P(P))} \rightleftharpoons \text{GA(P)}. \Delta G = +5 \text{ ккал/моль}$
5. $\text{DHA(P)} \rightleftharpoons \text{GA(P)}. \Delta G = +1,5 \text{ ккал/моль}$
6. $\text{GA(P)} \rightleftharpoons \text{PG(P)}. \Delta G = +3,5 \text{ ккал/моль}$
равновесие смещено в сторону обратной реакции
7. $\text{PG(P)} \rightleftharpoons \text{3-PG}. \Delta G = -4 \text{ ккал/моль}$
8. $\text{3-PG} \rightleftharpoons \text{2-PG}. \Delta G = 0 \text{ ккал/моль}$
9. $\text{2-PG} \rightleftharpoons \text{PEPvt}. \Delta G = +0,5 \text{ ккал/моль}$
10. $\text{PEPvt} \rightarrow \text{Pvt}. \Delta G = -7 \text{ ккал/моль}$

До стадии PEPvt суммарно $\Delta G = 0 \text{ ккал/моль}$ (рис. 2.1). Последняя 10-я стадия делает весь процесс гликолиза необратимым и окончательно смещает равновесие всех реакций.

Роль фосфорилирования промежуточных продуктов

1. Процесс гликолиза идёт в цитозоле, и всё, что образуется в результате, тоже не должно выходить за пределы клетки, поскольку энергия необходима именно там, где пошёл процесс. Заряженные соединения плохо проходят через мембрану, для глюкозы и пирувата есть специальные переносчики. Для всех фосфорилированных соединений таких переносчиков нет, что позволяет организму не тратить энергию на их удержание внутри клетки. Таким образом, все промежуточные продукты гликолиза локализованы там, где они и должны быть.

2. Фосфатная группа определённым образом активировывает промежуточные соединения, что хорошо, так как они становятся несколько более реакционно-способными.

3. Через фосфатные группы дополнительно организовываются не валентные взаимодействия. Это способствует снижению энергетического барьера ферментативной реакции за счёт стабилизации переходного состояния.

Кроме того, фосфорилированные соединения существуют в комплексе с Mg^{2+} . Большинство ферментов проявляют специфичность не к субстратам, а к их комплексам с Mg^{2+} . Препараты типа «Кардиомагнил» помогают действию сердечной мышцы. Они поставляют Mg, чтобы гликолиз протекал активнее.

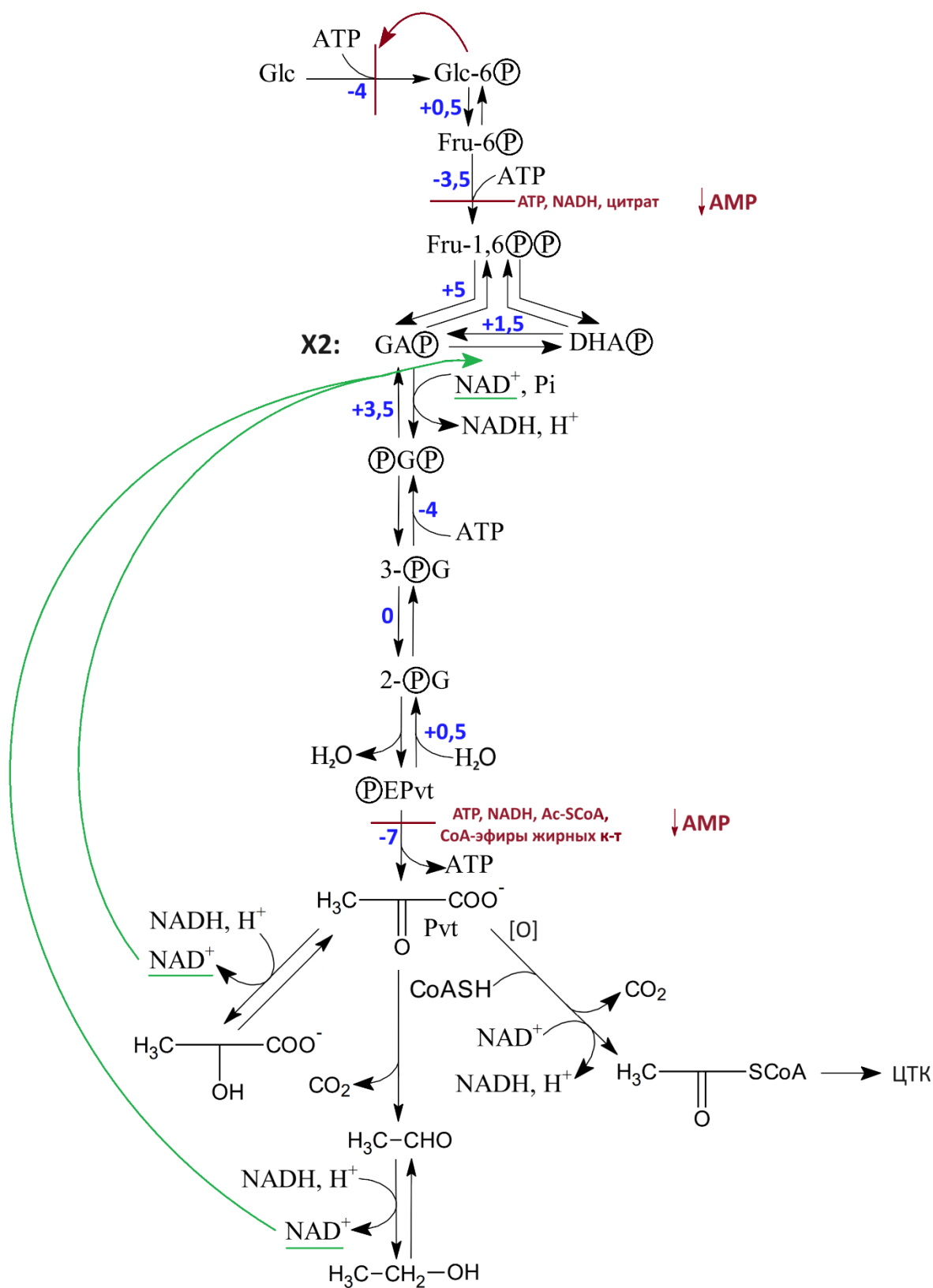


Рис. 2.1. Схема гликолиза

Регуляторные стадии гликолиза

Регуляторные стадии в основном не обратимы (рис. 2.1. выделено красным):

- $\text{Glc} \rightarrow \text{Glc-6(P)}$

Гексокиназа ингибируется продуктом реакции (Glc-6(P)), когда его концентрация возрастает, что свидетельствует о его дальнейшей ненужности.

- $\text{Fru-6(P)} \rightleftharpoons \text{Fru-1,6(P(P))}$

Для этой стадии блоками являются АТФ, NADH, цитрат. Мощный модулятор АМФ

- $\text{P(EPvt)} \rightarrow \text{Pvt}$

Для этой стадии блоками являются АТФ, NADH, Ас-SCoA, CoA-эфиры жирных кислот. Мощный модулятор АМФ

Высокая концентрация любого высокоэнергетического соединения является индикаторами хорошего энергетического состояния клетки. Такие соединения блокируют процесс, выступая ингибиторами соответствующих ферментов. Когда возрастает концентрация АМФ, это означает, что в клетке плохое энергетическое состояние, поэтому нужно максимально стимулировать процесс разложения углеводов.

Брожение

Образующийся в результате гликолиза пируват претерпевает дальнейшие превращения по одному из трёх основных путей катаболизма:

1. В кислородной среде: $\text{Pvt} \rightarrow \text{Ac-CoA} \rightarrow \text{ЦТК}$

У аэробных организмов и в тканях при аэробных условиях гликолиз – это всего лишь первая стадия полного расщепления глюкозы. При окислении пирувата образуется ацетогруппа ацетилкофермента А, а карбоксильная группа пирувата превращается в CO_2 . Далее ацетогруппа полностью окисляется до CO_2 в цикле лимонной кислоты. Эти процессы сопровождаются переносом электронов на молекулу O_2 с образованием H_2O в митохондриях. Энергия, высвобождаемая при переносе электронов, является движущей силой образования АТФ в митохондриях.

Брожение – это общий термин, обозначающий анаэробное разложение глюкозы или других органических питательных веществ с целью высвобождения энергии, запасаемой в виде АТФ.

2. Молочнокислородное брожение – восстановление пирувата до аниона молочной кислоты (лактата).

При интенсивной работе мышц в условиях недостатка кислорода (гипоксия) NADH не может вновь превращаться в NAD^+ , однако NAD^+ как акцептор электронов необходим для дальнейшего окисления пирувата. В таких условиях пируват восстанавливается до лактата, принимая электроны от NADH, в результате чего образуется NAD^+ , необходимый для продолжения гликолиза. В реакции участвует фермент лактатдегидрогеназа. Некоторые типы клеток и тканей (например, клетки

сетчатки и эритроциты) превращают глюкозу в лактат даже в аэробных условиях. Кроме того, некоторые микроорганизмы также образуют лактат в процессе гликолиза в анаэробных условиях.

3. Спиртовое брожение: превращение пирувата в этанол и CO_2 в некоторых тканях растений, у определенных видов беспозвоночных, простейших и микроорганизмов (например, у пекарских дрожжей) при недостатке кислорода или в анаэробных условиях

Неокислительное декарбоксилирование пирувата идёт с образованием ацетальдегида, который под действием фермента алкогольдегидрогеназы превращается в этанол.

Главный смысл 2 и 3 реакции для прокариотических организмов, которые живут за счёт брожения, заключается в том, чтобы зациклить систему и дальше использовать эту реакцию (то есть перерабатывать следующие эквиваленты глюкозы). В результате данных реакций регенерируется NAD^+ , который необходим для дальнейшей переработки глюкозы.

Задача на механизм ретроальдольной конденсации

Условие: в гликолиз входит глюкоза, меченая по первому атому углерода.

Вопрос: в каком положении она окажется при молочнокислом брожении?

Ответ: в метильной группе

Решение: рис. 2.2.

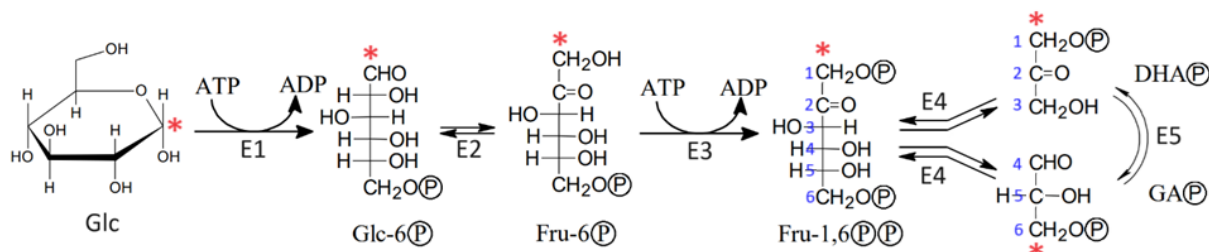


Рис. 2.2. Решение задачи

Рассмотрим подробнее стадию ретроальдольной конденсации (4-ю стадию), на которой Fru-1,6(P)(P) режется на два 3-х углеродных фрагмента. Образуется альдегид, который изомеризуется в глицеральдегид. Изомеризация возможна только между 2 и 3 атомом углерода, потому что первый закрыт фосфатной группой. Таким образом, эквивалентные атомы углерода: $\text{C}_1 \equiv \text{C}_6$ $\text{C}_2 \equiv \text{C}_5$ $\text{C}_3 \equiv \text{C}_4$. Именно поэтому метка останется в метильной группе.

Лекция 3. Унификация топлива. ЦТК

Альтернативные субстраты для гликолиза

Гликолиз идёт практически во всех клетках организма (сердце, скелетные мышцы, печень, головной мозг). Это очень крупнотоннажный путь, в котором участвует множество ферментов. Основное топливо – глюкоза. Но практически любой похожий сахар может вовлекаться в этот процесс (рис. 3.1). Из моносахаридов – манноза, фруктоза и галактоза, из дисахаридов – мальтоза, лактоза, сахароза, из полисахаридов – крахмал, гликоген. Если попадается отличный сахар, для него не создаётся отдельного пути, его пытаются подогнать к существующему с помощью нового фермента.

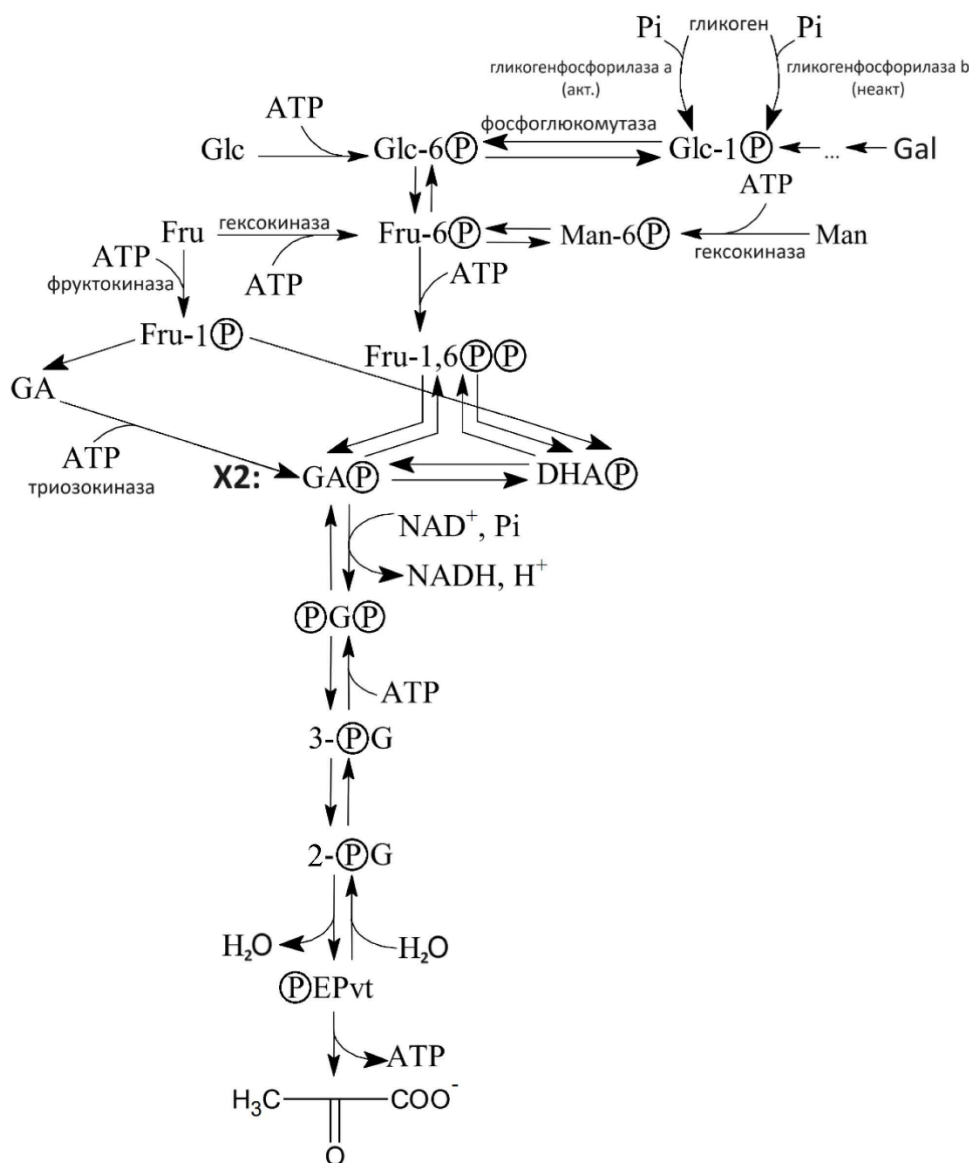


Рис. 3.1. Гликолиз с альтернативными субстратами

1. **Манноза** за счёт АТФ под действием фермента гексокиназы превращается в маннозо-6-фосфат, который под действием маннозофосфатизомеразы превращается во фруктозо-6-фосфат. Далее путь гликолиза тот же, что и у глюкозы.

2. **Фруктоза** за счёт АТФ под действием гексокиназы превращается во фруктозо-6-фосфат. Это основной путь для утилизации фруктозы в скелетных мышцах и почках. В печени фруктоза точно так же за счёт АТФ и фермента фруктокиназы превращается во фруктозо-1-фосфат. Далее сразу идёт ретроальдольная конденсация – деление на две трёхуглеродные молекулы (DHA[Ⓟ] и GA). GA за счёт АТФ под действием триозокиназы превращается в GA[Ⓟ]. Далее цикл идёт так же.

3. **Галактоза** сама по себе появляется редко. Основной её источник – молоко (лактоза) и желе/ягоды (галактуроновая кислота из пектинов). Основная проблема галактозы в том, что её хвост отличается от глюкозы, фруктозы и маннозы. Разница в четвёртом положении (галактоза – это эпимер глюкозы по 4-му атому углерода).

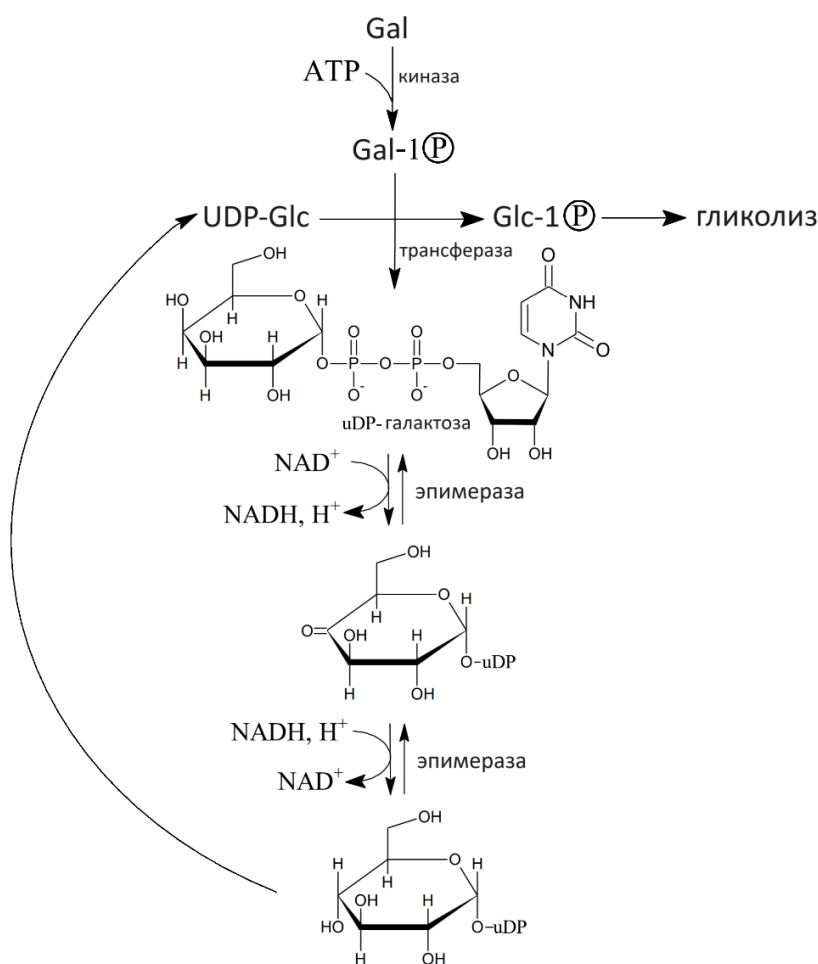


Рис. 3.2. Вовлечение галактозы в процесс гликолиза

На первом этапе галактоза за счёт АТФ под действием галактокиназы превращается в галактоза-1-фосфат. Она встречается с UDP-глюкозой, происходит трансферазная реакция: уходит глюкозо-1-фосфат (идёт в гликолиз), и остается UDP-галактоза. UDP-галактоза вступает в реакцию эпимеризации. С помощью одного фермента путём окисления-восстановления через две стадии производное галактозы превращается в производное глюкозы. Глюкозо-1-фосфат под действием фосфоглюкомутазы превращается в глюкоза-6-фосфат. Таким образом галактоза вовлекается в процесс гликолиза (рис. 3.2).

4. **Олигосахариды** под действием ферментов (лактаза, мальтаза, целлюбиаза, сахараза/инвертаза) разбираются до моносахаридов – в основном до глюкозы, фруктозы и галактозы, которые вовлекаются в гликолиз уже известными путями.

5. **Крахмал** – это запасной полисахарид растений. Представляет собой полимер из остатков глюкозы, соединенных 1,4 α -гликозидными связями. Состоит из линейного компонента – амилозы (его больше) и разветвлённого – амилопектина.

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

Гликоген – это разветвлённый гомополимер глюкозы (рис. 3.3), в котором остатки глюкозы соединены $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидной связью. Связи в точках ветвления находятся в положении $\alpha(1\rightarrow6)$ примерно каждого 10-го остатка. Гликоген обращён наружу нередуцирующим концом (то есть четвёртым атомом углерода), редуцирующие концы заняты на образование связи. Иначе гликоген был бы слишком реакционно способным, и в итоге запас не получалось бы сохранить.

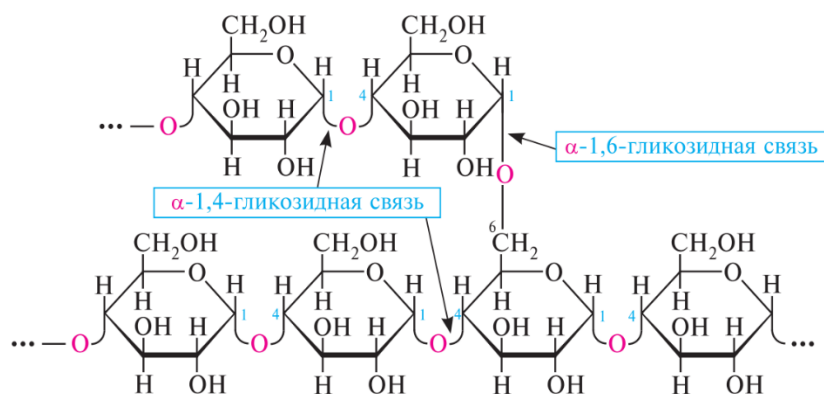


Рис. 3.3. Структура гликогена

Когда нужна энергия, к гликогену подходит фермент гликогенфосфорилаза и катализирует реакцию, в результате которой под действием неорганического фосфата с нередуцирующего конца отщепляется 1 остаток глюкозы в виде глюкоза-1-фосфата, а данная цепь гликогена становится на 1 звено короче (рис. 3.4).

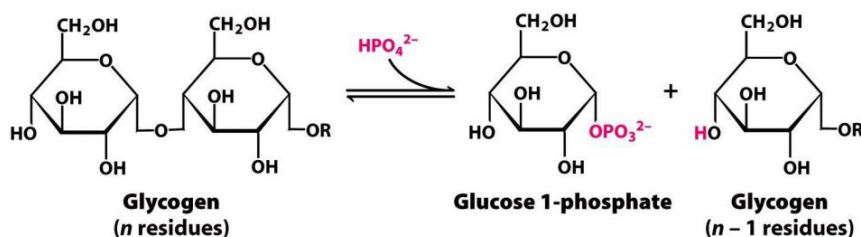


Рис. 3.4. Реакция с участием фермента гликогенфосфорилаза

Реакция идёт в несколько этапов до тех пор, пока из точки ветвления не останется всего 4 остатка глюкозы. Затем под действием фермента 1,6-трансгликозидаза происходит перенос 3-х остатков глюкозы на нередуцирующий конец, находящийся неподалёку, а четвёртый остаток отправляется в путь в виде глюкозы (рис. 3.5). Таким образом, образовавшийся глюкоза-1-фосфат через фосфоглюкомутазу вовлекается в гликолиз.

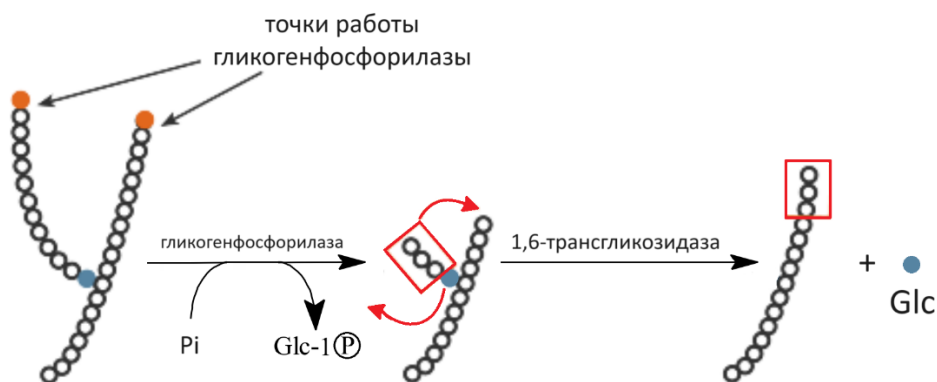


Рис. 3.5. Схема реакции расщепления гликогена

Гликогенфосфорилаза существует в двух базовых формах: гликогенфосфорилаза а (высокоактивна), гликогенфосфорилаза в (почти не активна).

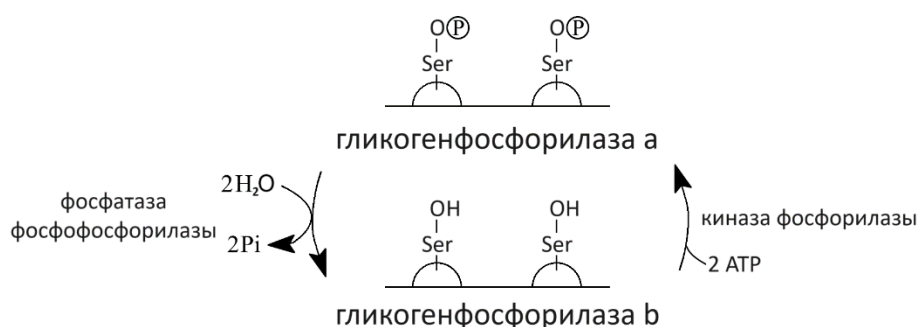


Рис. 3.6. Регуляция активности гликогенфосфорилазы

Активация происходит, когда нужна энергия. Переход из неактивной формы в активную осуществляется через фосфорилирование остатков серина за счёт АТФ под действием фермента киназа фосфорилазы. При необходимости деактивировать

гликогенфосфорилазу приходит фермент фосфатаза фосфофосфорилазы, который гидролизует фосфатные группы с остатков серина.

Пируватдегидрогеназный комплекс

Цикл трикарбоновых кислот (цикл лимонной кислоты, цикл Кребса) в одних случаях выступает как топка, а в других физиологических условиях – как универсальный приёмо-раздаточный маховик.

В цикл Кребса попадает двухуглеродный (ацетильный) фрагмент, а на выходе из гликолиза получается трёхуглеродный пируват. То есть пируват должен превратиться в ацетилкофермент А, и только в таком виде попасть в цикл Кребса.

У разных организмов пируватдегидрогеназный комплекс организован по-разному, но процессы протекают похоже. Его молекулярная масса у *E. coli* – 6,5 МДа.

Пируватдегидрогеназный комплекс включает:

- 3 каталитических фермента:
 - Е1 – пируватдегидрогеназа
 - Е2 – дигидролипоилацетилтрансфераза
 - Е3 – дигидролипоилдегидрогеназа
- 2 регуляторных фермента (киназа и фосфатаза; неактивная форма фосфорилированная, активная – дефосфорилированная)
- 5 коферментов/кофакторов: TPP, липоевая кислота, CoA-SH, FAD, NAD⁺

Тиаминпирофосфат – производное витамина В1. Витамин В1 (тиамин) состоит из двух колец, связанных СН₂ мостиком. Это первый витамин, химическая структура которого была установлена, выяснилось, что это амин. «Витамин – амин, дающий жизнь».

Кофакторная форма – тиаминпирофосфат (рис. 3.7). У тиамина есть пирофосфатная связь с ферментом через фосфатные группы. Он обладает аномально подвижным водородом в тиазольном кольце за счёт резонансных стабилизаций. В этом месте может образовываться С-С связь. TPP участвует в разнообразных реакциях, часто встречается в реакциях декарбоксилирования.

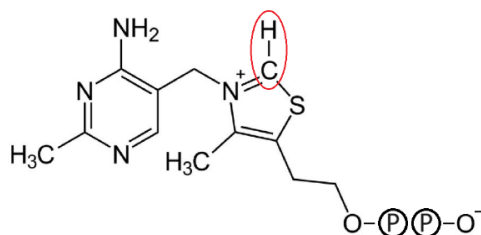
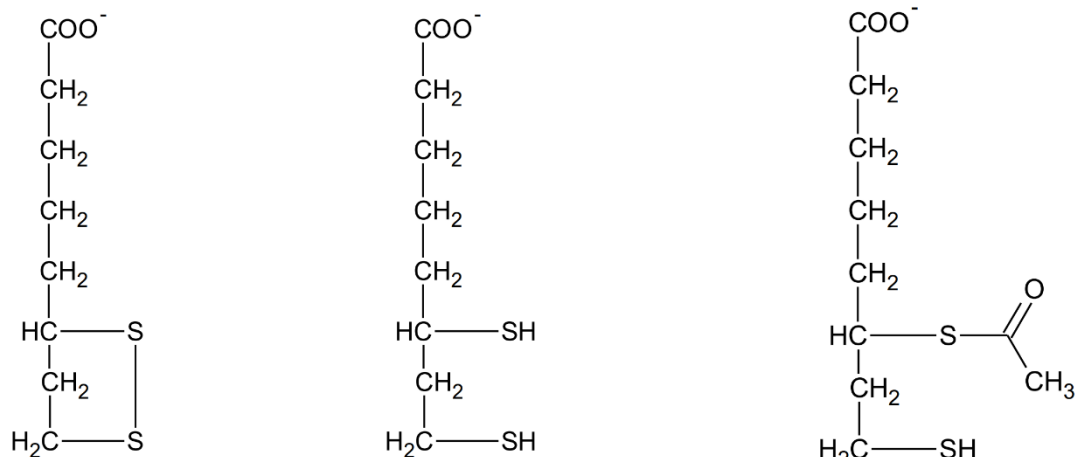


Рис. 3.7. Тиаминпирофосфат (TPP)

Липоевая кислота – это кислота с 8-ю атомами углерода, содержащая между С₆ и С₈ две тиольные группы, соединенные во внутренне-дисульфидный мостик. Она может быть также в двух формах: дигидролиповая кислота (восстановленный дисульфидный мостик) и ацетилдигидролиповая кислота.



липоевая кислота

дигидролипоевая кислота

ацетилдигидролипоевая кислота

Рис. 3.8.

Липоевая кислота и её производные относятся к группе молекулярных кронштейнов. Это длинные гибкие подвижные молекулы. В пируватдегидрогеназном комплексе липоевая кислота амидной связью зацепляется за ε-аминогруппу лизина.

- 5 реакций:

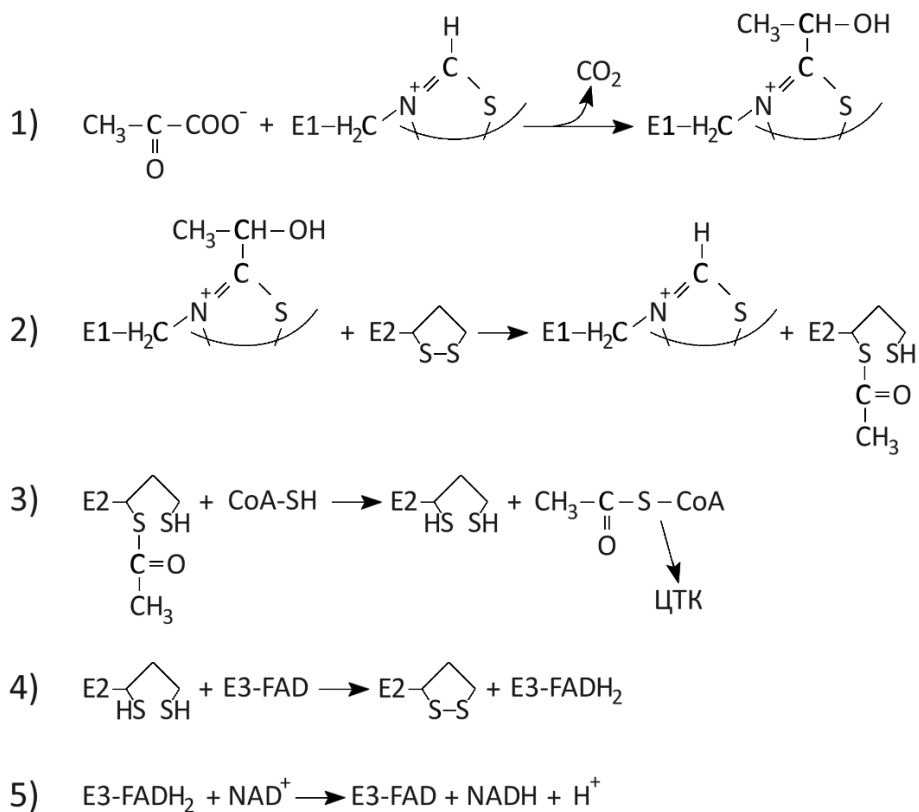


Рис. 3.9. Реакции в пируватдегидрогеназном комплексе

1. Пируват встречается с ферментом E1, из которого торчит тиазольное кольцо (ТРР). Тиаминпирофосфат участвует в декарбоксилировании. Улетает карбоксильная группа в виде CO_2 . Фермент E1 загружается гидроксиэтильным остатком.
2. Подходит фермент E2, из которого торчит липоевая кислота. В этот момент происходит окислительно-восстановительная реакция. E1 восстанавливается в исходном виде, теперь он готов принимать следующую молекулу пирувата. E2 переходит в форму S-ацетилдигидролипоевой кислоты. С одной стороны карбонильная группа окислилась до карбоксильной, а с другой стороны восстановился S-S мостик до двух SH-групп.
3. На ферменте E2 есть специальный сайт для посадки кофермента A. Происходит тиолиз по карбонильному углероду. В результате E2 остаётся в восстановленном виде и не может дальше работать. Ацетилкофермент A покидает процесс и идёт в ЦТК.

Дигидролипоевая кислота теперь не может принимать следующее гидроксиэтильное производное. Две последующие стадии нужны, чтобы вернуть липоевую кислоту в исходное состояние.

4. E2 в восстановленной форме встречается с E3, из которого торчит FAD. В результате реакции регенерируется правильная форма фермента E2 (с дисульфидным мостиком), а E3 превращается в восстановленную форму FAD (E3-FADH_2). FAD – это кофактор, он прочно связан с E3 и не может просто так уйти. Но FAD легко окисляет липоевую кислоту, при этом сам восстанавливается.
5. На ферменте E3 есть отдельное место для посадки NAD. E3-FADH_2 встречается с NAD^+ . В результате E3 регенерируется в правильной форме, получается NADH и H^+ .

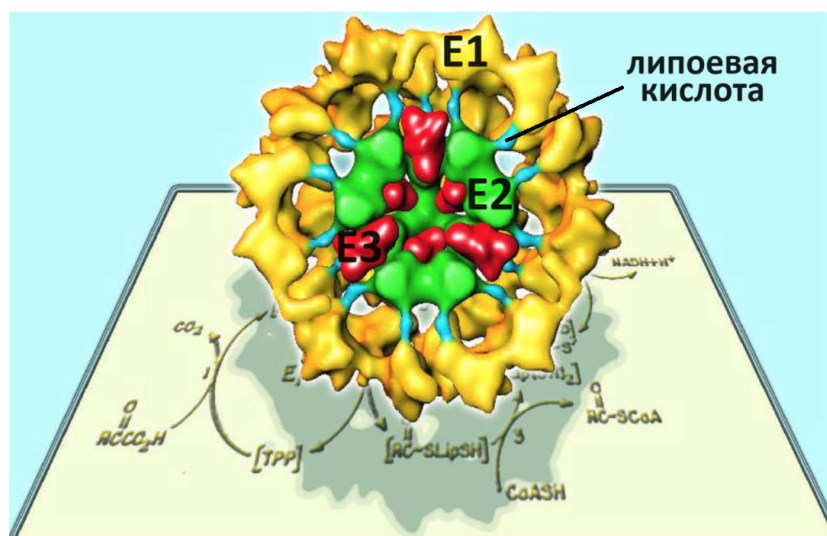


Рис. 3.10. Пируватдегидрогеназный комплекс

Цикл трикарбоновых кислот

Итак, из пирувата за счёт NAD^+ получается ацетилкофермент А, который входит в цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса). На этой стадии улетает CO_2 .

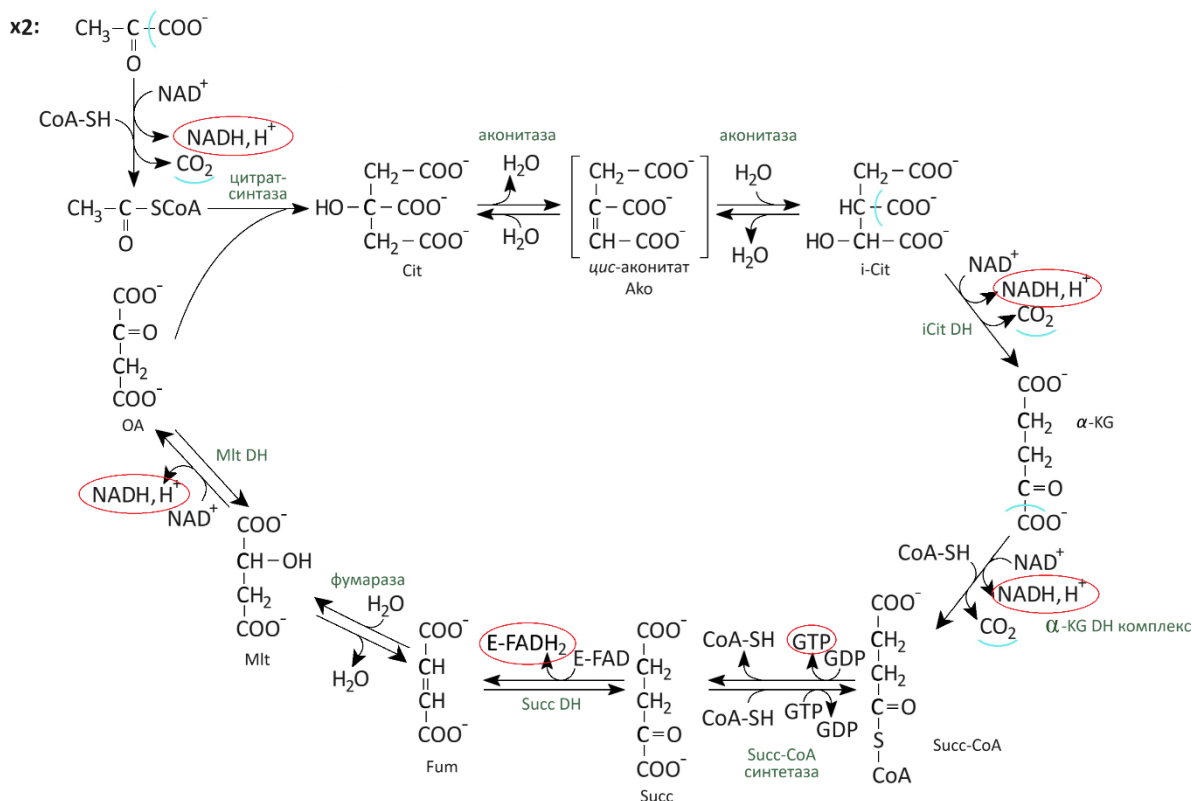


Рис. 3.11. Цикл трикарбоновых кислот

1. Ацетилкофермент А встречается с 4-х углеродной молекулой оксалоацетата (OA). В протонированной форме это дикарбоновая оксалоуксусная кислота. Эти два соединения объединяются. Уходит кофермент А, получается симметричная молекула цитрата. Это трёхосновная карбоновая кислота. Эта реакция является главной и необратимой стадией цикла трикарбоновых кислот, она идёт с существенным снижением ΔG . Фермент, катализирующий эту реакцию – **цитратсинтаза** (синтетаза использует энергию АТФ, а синтаза не расходует АТФ, энергия берётся из эфиров CoA).

2. Обратимая реакция, перенос OH-группы. Уходит вода, образуется анион *цис*-аконитовой кислоты (*цис*-аконитат, Aco). Фермент – **аконитаза**. В норме соединение не покидает активного центра, после дегидратации сразу идёт гидратация. В результате образуется ещё одна трикарбоновая кислота, но OH-группа уже в другом положении – *изо*цитрат (i-Cit). На этом набор трикарбоновых кислот, которые есть в цикле Кребса, заканчивается. Отдельно эту реакцию можно провести в обратную сторону, но в рамках всего цикла – нет, поскольку цитрат-синтазная стадия закручивает цикл по часовой стрелке.

3. Окислительное декарбоксилирование, OH-группа окисляется до карбонильной, улетает карбоксильная группа в виде CO₂. Реакция необратима. При этом NAD⁺ (или NADP⁺) превращается в NAD(P)H и H⁺. Фермент – **изоцитратдегидрогеназа**. В результате остаётся пятиуглеродная дикарбоновая α-кета кислота с двумя карбоксильными группами – α-кетоглутарат. Этот цикл называется циклом Кребса (или циклом лимонной кислоты).

4. Снова окислительное декарбоксилирование. Приходит кофермент А, улетает ещё одна карбоксильная группа в виде CO₂ группа, NAD⁺ превращается в NADH, H⁺. Получается сукцинилкофермент А. Фермент – **α-кетоглутаратдегидрогеназный комплекс**. Всё происходит так же, как и в пируватдегидрогеназном комплексе, отличия только в регуляции.

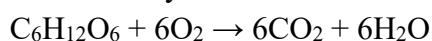
5. Обратимая реакция, уходит кофермент А, остается сукцинат (Succ). Фермент назван в честь обратной реакции – **сукцинил-КоА синтетаза**. В реакцию входит сверхвысокоэнергетическое соединение (Succ-CoA), нельзя просто так терять энергию, поэтому GDP превращается в GTP.

6. Карбонильную группу проще всего получить из гидроксильной. Её в свою очередь можно получить реакцией гидратации. Таким образом, на данном этапе от сукцината нужно забрать 2 водорода (обратимая дегидрогеназная реакция). Образуется фумаровая кислота. Фермент – **сукцинатдегидрогеназа**. При этом E-FAD превращается в E-FADH₂.

7. Обратимая гидратация. Образуется анион яблочной кислоты – малат. Фермент – **фумараза**. Он проявляет специфичность только к *транс*-форме, то есть субстратом может являться только фумаровая кислота, а малеиновая – нет. В обратную сторону фермент катализирует реакцию, субстратом которой может являться только L-малат. С D-изомером фумаразы не работает.

8. Малат окисляется до оксалоацетата, цикл замыкается. При этом NAD⁺ превращается в NADH, H⁺. Фермент – **малатдегидрогеназа**.

На входе в цикл трикарбоновых кислот и в самом цикле мы потеряли все 6 эквивалентов CO₂, которые должны получиться из глюкозы:



Главная задача цикла трикарбоновых кислот – аккумулировать всю энергию в виде восстановленных форм коферментов/кофакторов. Не запасаемая энергия тратится на необратимость цикла.

На рис. 3.12 представлены все высокоэнергетические молекулы, получаемые в рассмотренных ранее процессах (начиная с гликолиза), а также их суммарная энергия, получаемая из 1 молекулы глюкозы, в пересчёте на 1 эквивалент молекулы АТФ.

Гликолиз и ЦТК протекают по разные стороны мембраны. Чтобы вовлечь в цикл Кребса те NADH, которые получились в гликолизе, нужно их перенести через мембрану. Это можно сделать с потерей энергии и без потери. Для этого используются глицерол-фосфатная малат-аспартатная челночные системы соответственно. Именно

поэтому в графе «NADH» возникает два возможных варианта итоговой накопленной энергии.

	коэф. пересчёта	кол-во	ИТОГ
АТФ	1	2	2
NADH	2,5	10	25 (23)
FADH ₂	1,5	2	3
GTP	1	2	2
Итого:			32 (30)

Рис. 3.12. Суммарный энергетический эффект гликолиза и ЦТК

Лекция 4. ЦТК: энергетика и регуляция

Физиологический смысл ЦТК

Цикл трикарбоновых кислот – это важный центральный метаболический путь. Глобально, в рамках функционирования организма на протяжении длительного времени, ЦТК – это универсальный приёмо-раздаточный механизм. Сюда сбрасывают свои атомы углерода углеводы, жирные кислоты и значительная часть аминокислот. Отсюда же разные метаболиты отбираются, чтобы строить нужные организмы молекулы, то есть происходит анаболизм.

В определённых ситуациях интенсивной работы, когда нужна энергия и анаболические процессы не идут, ЦТК выполняет функцию топки. То есть улетают все CO_2 , а энергия временно переносится на восстановленные формы кофермента/кофактора дегидрогеназных реакций + GDP.

В цикле Кребса происходит разложение уксусной кислоты до CO_2 и H_2O . Реакция кажется достаточно простой, но напрямую она идти не может, так как имеет высокий активационный энергетический барьер. А стоит помнить, что в организме реакция должна протекать в физиологических условиях без высоких температур, и аномальных давлений. Поэтому организму приходится выбирать оптимальный обходной путь, избегая высоких активационных энергетических барьеров.

Энергетика ЦТК

В стандартных условиях около 1/3 энергии тратится на запасание. В условиях клетки ΔG отличается от показателей в стандартных условиях. Таким образом, организму удаётся запастись 60-65% энергии.

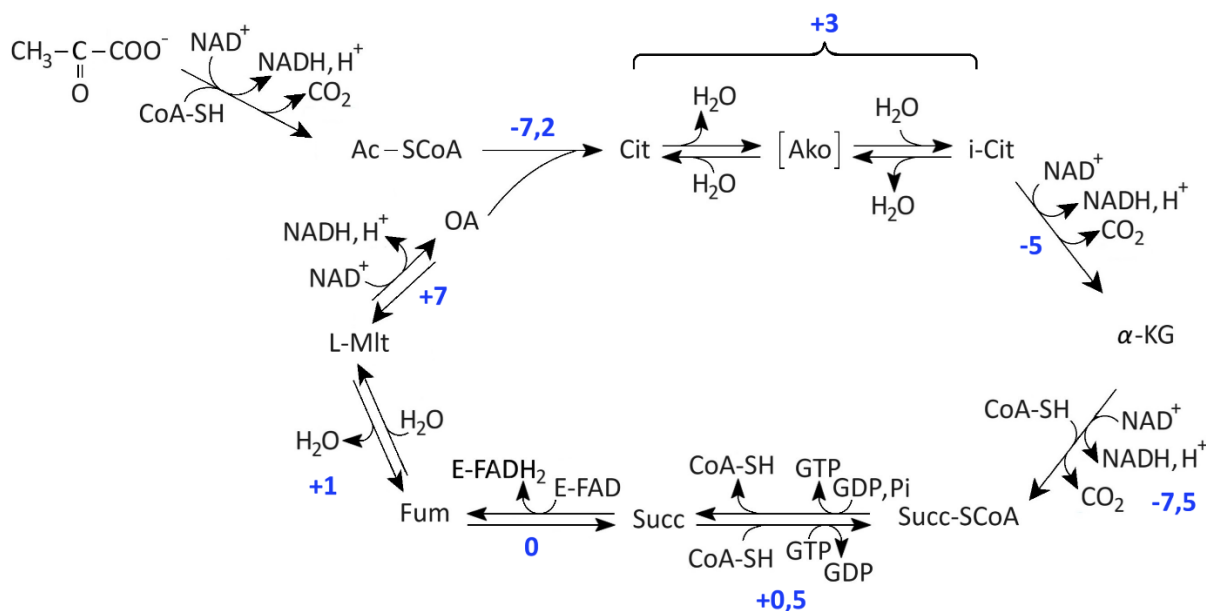
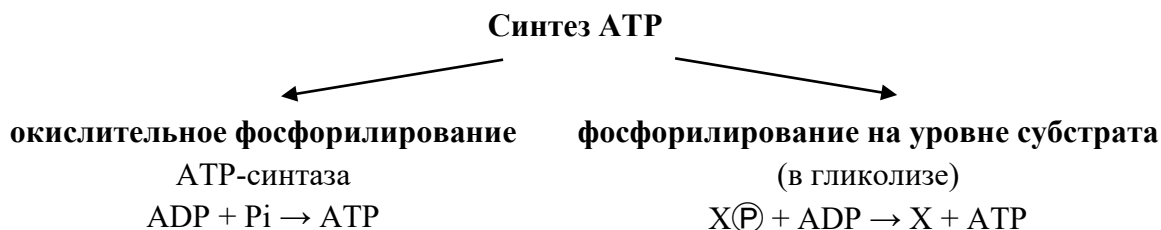


Рис. 4.1. ΔG стадий ЦТК, ккал

Интерес представляет реакция $L\text{-Mlt} \rightarrow \text{ОА}$. ΔG данной реакции $+7$, равновесие будет сильно сдвинуто в сторону малата. И организм этим пользуется (например, в малат-аспартатной челночной системе для переноса NADH через мембрану). Но цитрат-синтазная стадия окончательно закручивает цикл по часовой стрелке.

Принцип работы ферментов



Фермент сукцинил-КоА синтетазы реализует фосфорилирование на уровне субстрата. Фермент с остатком гистидина выступает в качестве X. В реакцию вступает Succ-S-CoA. Под действием фермента приходит P_i , вышибается CoA-SH. В активном центре остаётся фосфорилированный сукцинат, связанный с ферментом. На следующем этапе фосфат переносится на гистидин, а сукцинат покидает активный центр.

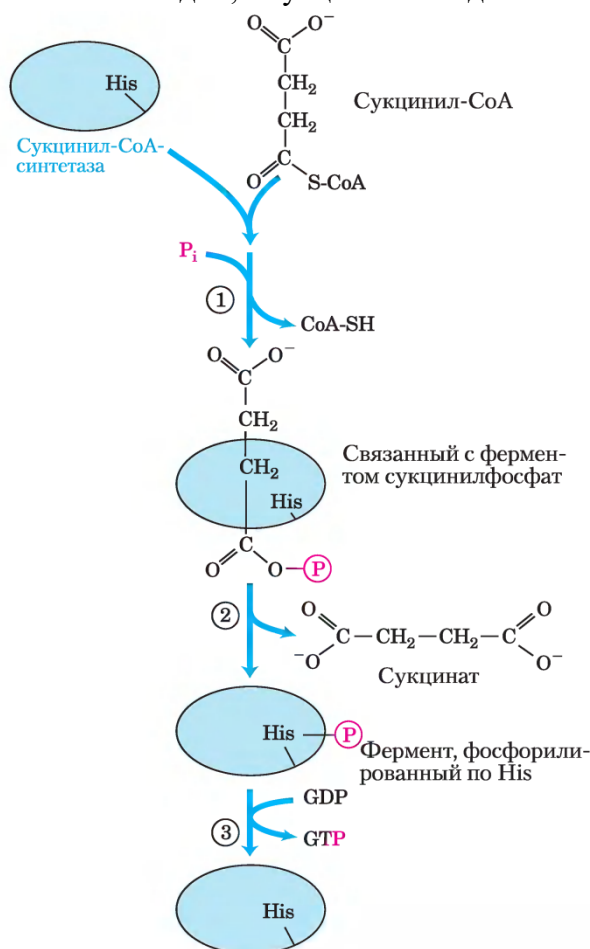


Рис. 4.2. Принцип работы сукцинил-КоА синтетазы

Реакция, катализируемая сукцинил-СоА- синтетазой, идёт по следующему механизму (рис. 4.2):

① фосфорильная группа замещает СоА в связанной с ферментом молекуле сукцинил-СоА, в результате чего образуется богатый энергией ацилфосфат

② сукцинилфосфат передаёт свою фосфатную группу на остаток His в молекуле фермента, и при этом образуется богатое энергией промежуточное соединение – фосфорилированный фермент

③ фосфатная группа переносится с остатка His к концевой фосфатной группе GDP (или ADP), что приводит к образованию GTP (или ATP)

Реакция идёт по упорядоченному двухсубстратному механизму. Сначала активный центр готов принимать фосфорилированный сукцинат, а после дефосфорилирования и ухода сукцината происходят конформационные изменения, и возникает центр посадки GDP. Он фосфорилируется, уходит GTP, снова происходят конформационные изменения, и фермент готов принимать следующую молекулу сукцинил-КоА.

В животных клетках существуют два изофермента сукцинил-СоА-синтетазы, один из которых специфичен к ADP, а другой к GDP. Фермент состоит из двух субъединиц:

- α – с фосфорилированным остатком His и центром связывания СоА
- β – определяет специфичность к ADP или GDP

Активный центр фермента расположен между двумя субъединицами. Исследование кристаллической структуры сукцинил-СоА-синтетазы выявило наличие двух «силовых» спиралей (по одной на каждой субъединице), ориентированных таким образом, что частичный положительный заряд электрических диполей локализован вблизи отрицательно заряженного His, что стабилизирует фосфорилированный фермент.

Регуляция ЦТК

Главные регуляторные точки в ЦТК – это, как всегда, необратимые стадии. Высокоэнергетические соединения тормозят процесс, а низкоэнергетические – стимулируют.

Ингибиторы:

- В пируватдегидрогеназном комплексе блоком являются NADH (непосредственный продукт дегидрогеназной реакции), ATP, СоА-эфиры жирных кислот, сукцинил-КоА. Все ингибиторы являются высокоэнергетическими соединениями.
- В цитратсинтазной реакции блоком являются NADH, ATP и цитрат.
- В α -кетоглутаратдегидрогеназном комплексе блоком являются NADH и Succ-CoA (непосредственный продукт реакции).

Активаторы:

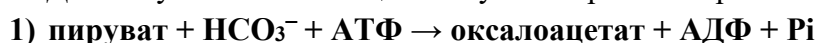
- В изоцитратдегидрогеназной реакции мощным активатором является ADP
- В пируватдегидрогеназном комплексе реакцию стимулирует AMP
- Цитратсинтазную реакцию стимулирует AMP

Анаплеротические реакции

Анаплеротические реакции – это реакции, пополняющие пул промежуточных продуктов ЦТК. Некоторые из них используются только для этих целей.

Когда начинают использоваться углеводные запасы, организм производит пируват и ацетил-КоА. Оба соединения важны и задействованы в анаплеротических реакциях. Из промежуточных соединений ЦТК пируват больше всего похож на оксалоацетат. Это ещё одна регуляторная точка: концентрация оксалоацетата в значительной степени определяет совокупную скорость работы ЦТК.

Для получения оксалоацетата нужно карбоксилировать пируват:



Реакция протекает преимущественно в печени или почках. Она почти не обратима. Фермент, катализирующий эту реакцию – **пируват карбоксилаза**. В норме, пока достаточно оксалоацетата, этот фермент практически не активен. Пока нормально крутится ЦТК, концентрация ацетил-КоА невелика, он сразу уходит в цикл. Когда не хватает оксалоацетата, начинают накапливаться пируват и ацетил-КоА. Пируват используется в качестве субстрата, а в качестве положительного эффектора выступает вещество, концентрация которого возросла – ацетил-КоА. Без него пируват карбоксилаза практически не работает.

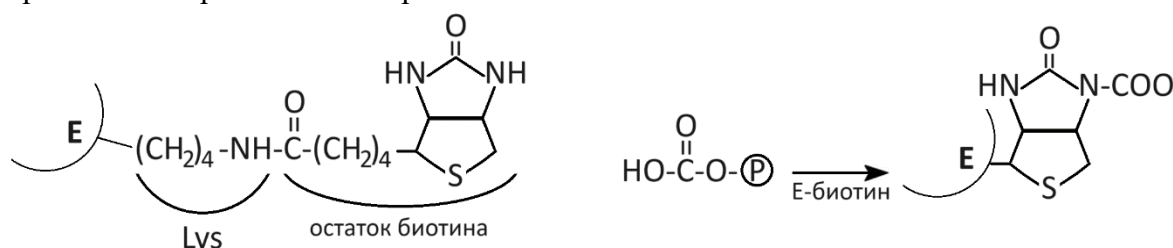
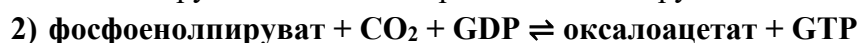


Рис. 4.3. Строение молекулярного кронштейна и перенос карбоксильной группы

В качестве кофактора пируват карбоксилаза содержит биотин (витамин Н). Он крепится к лизину через амидную связь (рис. 4.3). Это тоже молекулярный кронштейн. У фермента есть 2 активных центра. На одном из них происходит активация двуокиси и её перенесение на биотин. Затем кронштейн переходит на второй центр, и карбоксильная группа с биотина переносится на пируват.



Реакция преобладает в скелетных мышцах и сердце. Фермент, катализирующий эту реакцию – **фосфоенолпируваткарбоксикиназа**. Реакция обратимая, даже чаще организм использует её в обратном направлении.

Принципиальное различие этих двух реакций заключается в том, что пируват – низкоэнергетическое соединение, а второе – сверхвысокоэнергетическое соединение, в нём энергии в 2 раза больше, чем в молекуле АТФ. 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 ещё остается на макроэргическую связь. Поэтому во втором случае используется GDP. В первом случае происходит трата энергии, во втором случае ещё и запасание.

3) фосфоенолпируват + $\text{HCO}_3^- \rightarrow$ оксалоацетат + P_i

Фермент – **фосфоенолпируваткарбоксилаза**. Эта реакция протекает в фотосинтезирующих частях растений, а также в простейших. Смысл этой реакции в подавляющем большинстве случаев – не пополнить пул оксалоацетатом, а поймать CO_2 и отправить в фотосинтез.

4) пируват + $\text{HCO}_3^- + \text{NAD(P)H} + \text{H}^+ \rightleftharpoons$ малат + NAD(P)^+

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

Пути атомов в ЦТК

Когда более полувека назад стали доступны соединения, обогащённые тяжёлым изотопом углерода ^{13}C и радиоактивными изотопами ^{11}C и ^{14}C , их сразу стали использовать для того, чтобы проследить путь атомов углерода в цикле лимонной кислоты. С одного из таких экспериментов началась дискуссия о роли лимонной кислоты.

Меченый по карбоксильной группе ацетат инкубировали с образцом животной ткани в аэробных условиях. В животных тканях ацетат ферментативным путём превращается в ацетил-СоА, поэтому в реакциях цикла можно было проследить путь меченого атома углерода ацетогруппы. После инкубации из препарата ткани выделили α -кетоглутарат, который затем подвергли химическому разложению для того, чтобы определить положение изотопа углерода. Можно было ожидать, что при конденсации немеченого оксалоацетата с меченым по карбоксильной группе ацетатом образуется цитрат, содержащий метку в одной из двух первичных карбоксильных групп.

Цитрат – симметричная молекула с двумя химически неразличимыми карбоксильными группами на концах. Следовательно, предполагалось, что половина молекул цитрата превратится в α -кетоглутарат, меченый по α -карбоксильной группе, а вторая половина – в α -кетоглутарат, меченый по γ -карбоксильной группе. То есть образуется смесь двух молекул, меченых по разным положениям (рис. 4.4, пути ① и ②). Однако выделенный из образца ткани α -кетоглутарат содержал метку ^{14}C только в γ -карбоксильной группе (рис. 4.4, путь ①). Отсюда был сделан вывод, что цитрат (или любая другая симметричная молекула) не может быть

интермедиа́том в процессе превращения ацетата в α-кетоглутарат, но первым продуктом, образующимся при конденсации ацетата и оксалоацетата, должна быть асимметричная трикарбоновая кислота, например, цис-аконитат или изоцитрат.

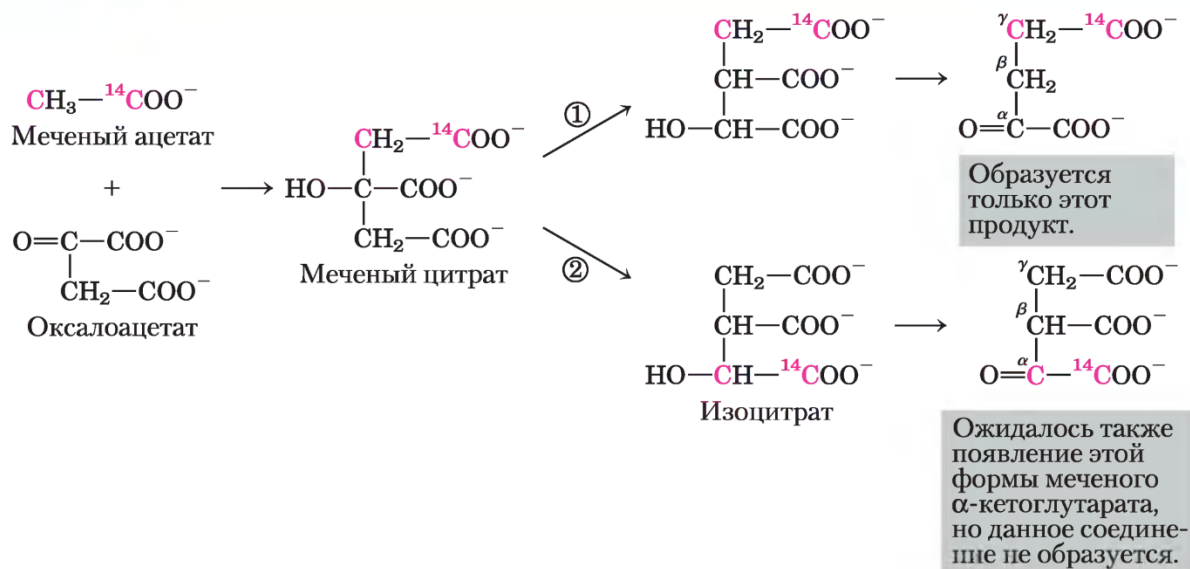


Рис. 4.4. Включение углеродной метки (^{14}C) из ацетогруппы в α-кетоглутарат

Хотя цитрат не имеет хирального центра, он может реагировать асимметричным образом, если у фермента, с которым он взаимодействует, асимметричное строение активного центра. Активный центр аконитазы имеет три участка связывания цитрата, а цитрат специфическим образом должен связываться с этими тремя участками одновременно. Как показано на рис. 4.5, связывание цитрата с этими тремя точками может осуществляться единственным способом, что объясняет образование лишь одного типа меченого α-кетоглутарата. Подобные цитрату органические молекулы, не имеющие хирального центра, но способные реагировать асимметричным образом с асимметричным активным центром фермента, получили название прохиральных молекул.

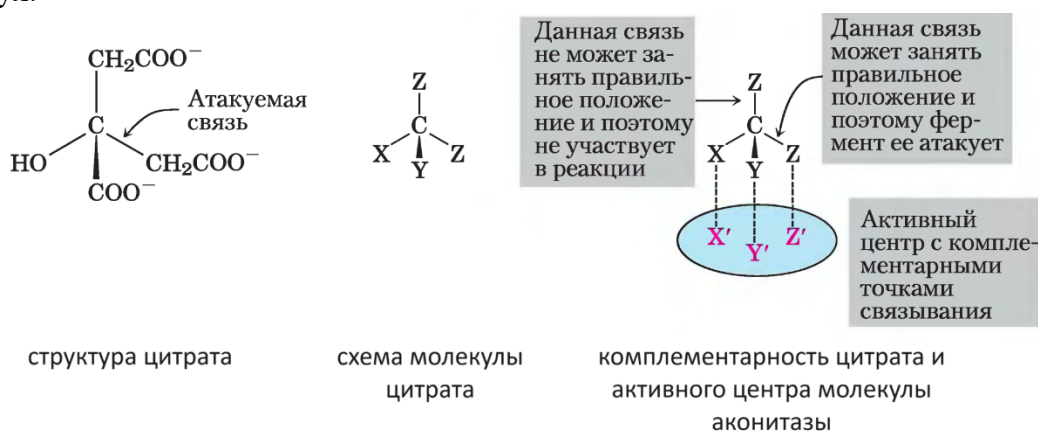


Рис. 4.5. Лимонная кислота – прохиральное соединение

Метка выйдет из цикла на втором его обороте (рис. 4.6). На этапе превращения сукцината в фумарат происходит перераспределение метки. Она может оказаться в двух положениях. На втором обороте метка может оказаться на двух карбоксильных группах, обе из которых выйдут из цикла в виде CO₂.

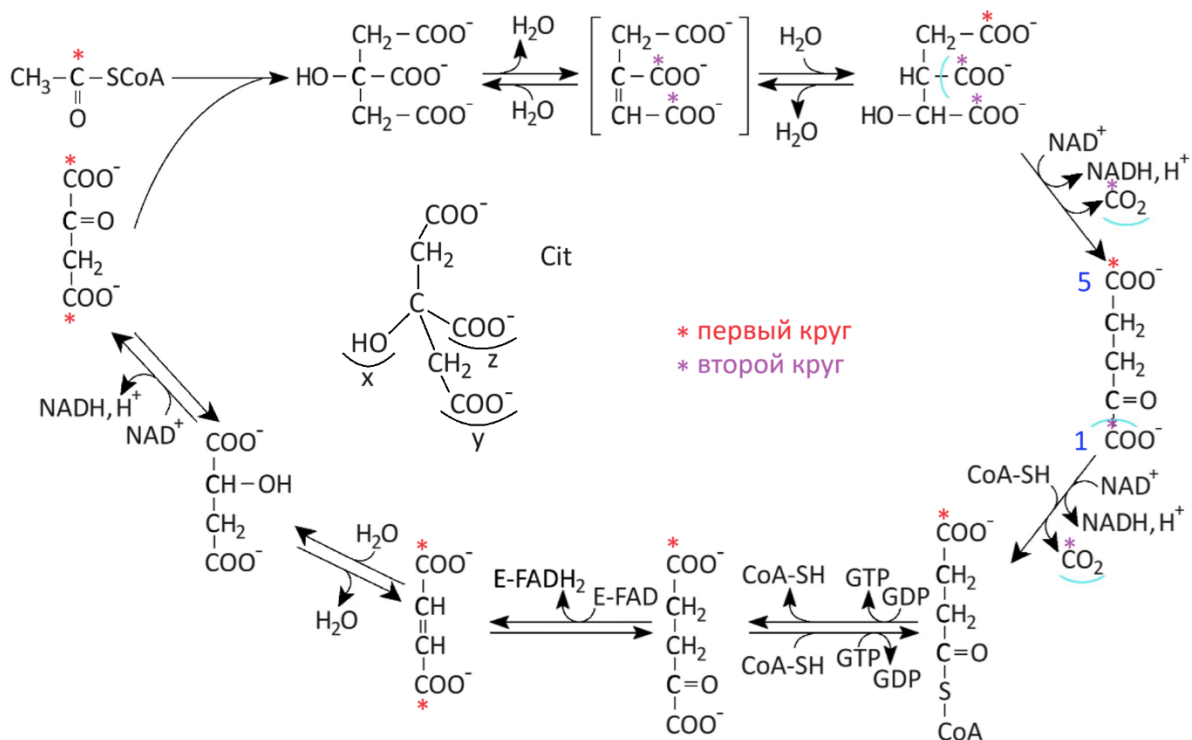


Рис. 4.6. Пути меченых атомов ¹⁴C в ЦТК

Дейтериевая метка так быстро не выйдет из ЦТК. Она очень сильно «размажется» и будет из раза в раз переходить в следующие циклы. Но в конечном счёте и дейтериевая метка, конечно, будет постепенно улетать.

Лекция 5. Цитология. ЭТЦ

Цитология. Прокариоты и эукариоты

Прокариоты – это простые одноклеточные организмы (в основном бактерии), у которых отсутствует организованное ядро или другие мембранные клеточные органеллы. Они имеют небольшие размеры (диаметр клетки от 0,1 до 5 мкм) размножаются простым делением пополам.

Строение прокариотической клетки:

- **плазматическая мембрана:** внешнее покрытие, отделяющее внутреннюю часть клетки от окружающей среды. Кроме того у многих прокариот есть **клеточная стенка** из мурина
- **цитоплазма:** желеобразный цитозоль внутри клетки, в котором находятся другие клеточные компоненты
- **ДНК:** генетический материал, находится в нуклеоиде
- **рибосомы:** органеллы, в которых происходит синтез белка
- **жгутики:** есть у некоторых прокариот, используются для передвижения

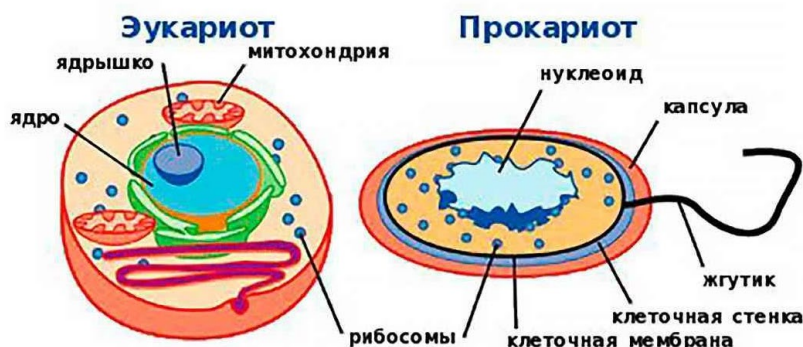


Рис. 5.1. Строение прокариотической и эукариотической клетки

Эукариоты – это организмы, в клетках которых имеется оформленное ядро с ядерной оболочкой, а также различные мембранные органеллы (рис. 5.2). К эукариотам относятся грибы, животные, растения и человек. Эукариотические клетки обычно в 10 тысяч раз больше прокариотических клеток.

Процессы матричного синтеза разделены в пространстве: в ядре происходит репликация и трансляция, в цитоплазме – трансляция и транскрипция, а также репликация ДНК в S периоде. Белок-синтезирующий аппарат – рибосомы. Одномембранные органоиды: ЭПС, аппарат Гольджи, мезосомы. Двумембранные органоиды: митохондрии и пластиды. Дыхание в митохондриях аэробное. Фотосинтез осуществляется на мембранах тилакоидов хлоропластов, в этом участвует хлорофилл а. Клеточный центр представлен 2-мя центриолями, каждая из которых состоит из 9 триплетов микротрубочек.



Рис. 5.2. Строение эукариотической клетки

Ядро – это структура клетки, которая выполняет функцию хранения и передачи наследственной информации, а также регулирует все жизненные процессы клетки. Ядро несёт в себе генетическую информацию в виде ДНК. Ядра обычно имеют шаровидную или яйцевидную форму. Ядро окружено ядерной оболочкой. Ядерная оболочка пронизана ядерными порами. Через них ядро обменивается веществами с цитоплазмой (внутренней средой клетки). Наружная мембрана переходит в эндоплазматический ретикулум и может быть усеяна рибосомами. Отношение размеров ядра и клетки зависит от функциональной активности клетки. Большинство клеток одноядерные. Двухядерными могут быть кардиомиоциты. Всегда двухядерны инфузории. В них характерен ядерный дуализм, то есть ядра различны по строению и функциям. Малое ядро (генеративное) – диплоидное. Оно обеспечивает только половой процесс у инфузорий. Большое (вегетативное) ядро полиплоидное. Оно регулирует все остальные жизненные процессы. Многоядерными бывают клетки некоторых простейших и клетки скелетной мускулатуры.

Поверхностный аппарат ядра включает: ядерную оболочку (кариолемму), поровые комплексы, периферическую плотную пластинку (ламину).

Функции комплекса ядерной поры:

- Обеспечение регуляции избирательного транспорта веществ между цитоплазмой и ядром
- Активный перенос в ядро белков
- Перенос в цитоплазму субъединиц рибосом

В ядро через ядерные поры поступают: синтезированные цитоплазматическими рибосомами белки-ферменты, которые участвуют в процессах репликации и репарации (восстановления повреждений в ДНК); белки-ферменты, участвующие в процессе транскрипции; белки-репрессоры, которые регулируют процесс транскрипции; белки-гистоны, которые связаны с молекулой ДНК и образуют хроматин; белки, входящие в

состав субъединиц рибосом; белки ядерного матрикса, образующие кариоскелет; нуклеотиды; ионы минеральных солей, в частности, ионы Са и Mg .

Из ядра в цитоплазму выходят и-РНК, т-РНК и субъединицы рибосом, которые представляют собой рибонуклеопротеидные частицы (р-РНК, связанные с белками).

Гиалоплазма – это часть цитоплазмы животных и растительных клеток, не содержащая структур, различимых в световом микроскопе. Она составляет примерно 53-55% от общего объема цитоплазмы, образуя гомогенную массу сложного состава. В гиалоплазме присутствуют белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, ферменты. При участии рибосом в гиалоплазме синтезируются белки, происходят различные реакции промежуточного обмена. В гиалоплазме располагаются также органеллы, включения и клеточное ядро. Основная роль гиалоплазмы – объединение всех клеточных структур в отношении их химического взаимодействия и обеспечения транспортных биохимических процессов.

Органеллы являются обязательными микроструктурами для всех клеток, выполняющими определенные жизненно важные функции. Различают мембранные и немембранные органеллы.

К мембранным органеллам, отграниченным от окружающей их гиалоплазмы мембранами, относятся эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи, лизосомы, пероксисомы, митохондрии.

Эндоплазматическая сеть представляет собой единую непрерывную структуру, образованную системой цистерн, трубочек и уплощенных мешочков. На электронных микрофотографиях различают зернистую (шероховатую, гранулярную) и незернистую (гладкую, агранулярную) эндоплазматическую сеть. Внешняя сторона зернистой сети покрыта рибосомами, незернистая лишена рибосом. Зернистая эндоплазматическая сеть синтезирует (на рибосомах) и транспортирует белки. Незернистая сеть синтезирует липиды и углеводы и участвует в их обмене (например, стероидные гормоны в корковом веществе надпочечников и клетках Лейдига; гликоген в клетках печени). Одной из важнейших функций эндоплазматической сети является синтез мембранных белков и липидов для всех клеточных органелл.

Комплекс Гольджи представляет собой совокупность мешочков, пузырьков, цистерн, трубочек, пластинок, ограниченных биологической мембраной. Элементы комплекса Гольджи соединены между собой узкими каналами. В структурах комплекса Гольджи происходят синтез и накопление полисахаридов, белково-углеводных комплексов, которые выводятся из клеток. Так образуются секреторные гранулы. Комплекс Гольджи имеется во всех клетках человека, кроме эритроцитов и роговых чешуек эпидермиса. В большинстве клеток комплекс Гольджи расположен вокруг или вблизи ядра, в экзокринных клетках – над ядром, в апикальной части клетки. Внутренняя выпуклая поверхность структур комплекса Гольджи обращена в сторону эндоплазматической сети, а внешняя, вогнутая – к цитоплазме.

Мембраны комплекса Гольджи образованы зернистой эндоплазматической сетью и переносятся транспортными пузырьками. От внешней стороны комплекса Гольджи постоянно отпочковываются секреторные пузырьки, а мембраны его цистерн постоянно обновляются. Секреторные пузырьки поставляют мембранный материал для клеточной мембраны и гликокаликса. Таким образом обеспечивается обновление плазматической мембраны.

Лизосомы представляют собой пузырьки диаметром 0,2-0,5 мкм, содержащие около 50 видов различных гидролитических ферментов (протеазы, липазы, фосфолипазы, нуклеазы, гликозидазы, фосфатазы). Лизосомальные ферменты синтезируются на рибосомах зернистой эндоплазматической сети, откуда переносятся транспортными пузырьками в комплекс Гольджи. От пузырьков комплекса Гольджи отпочковываются первичные лизосомы. В лизосомах поддерживается кислая среда, её рН колеблется от 3,5 до 5,0. Мембраны лизосом устойчивы к заключенным в них ферментам и предохраняют цитоплазму от их действия. Нарушение проницаемости лизосомальной мембраны приводит к активации ферментов и тяжёлым повреждениям клетки вплоть до её гибели.

Во вторичных (зрелых) лизосомах (фаголизосомах) происходит переваривание биополимеров до мономеров. Последние транспортируются через лизосомальную мембрану в гиалоплазму клетки. Непереваренные вещества остаются в лизосоме, в результате чего лизосома превращается в так называемое остаточное тельце высокой электронной плотности.

Митохондрии являются «энергетическими станциями клетки». Они участвуют в процессах клеточного дыхания и преобразования энергии в формы, доступные для использования клеткой. Основные функции: окисление органических веществ и синтез аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Много крупных митохондрий в кардиомиоцитах, мышечных волокнах диафрагмы. Они расположены группами между миофибриллами, окружены гранулами гликогена и элементами незернистой эндоплазматической сети. Митохондрии являются органеллами с двойными мембранами (толщина каждой около 7нм). Между наружной и внутренней митохондриальными мембранами расположено межмембранное пространство шириной 10-20 нм.

К немембранным органоидам относятся клеточный центр эукариотических клеток и рибосомы, имеющиеся в цитоплазме как эу-, так и прокариотических клеток.

Рибосома – это округлая рибонуклеопротеиновая частица диаметром 20-30 нм. Она состоит из малой и большой субъединиц, объединение которых происходит в присутствии матричной (информационной) РНК (мРНК). Одна молекула мРНК обычно объединяет несколько рибосом наподобие нитки бус. Такую структуру называют полисомой. Полисомы свободно располагаются в основном веществе цитоплазмы или прикреплены к мембранам шероховатой цитоплазматической сети. В обоих случаях они служат местом активного синтеза белка.

Бактериальные и эукариотические рибосомы отличаются константами седиментации: 70S у бактерий и 80S у эукариот. Если рибосомы поместить в среду с магнием, они распадаются на две субъединицы: большую и малую.

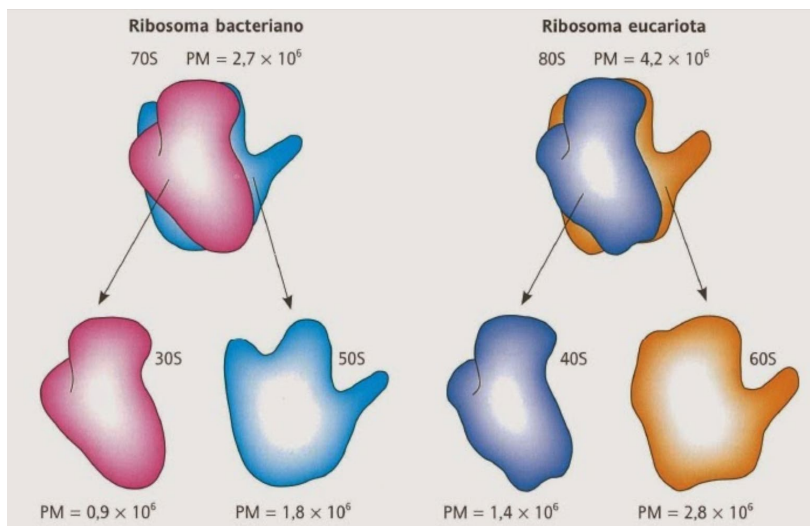


Рис. 5.3. Рибосомы прокариот и эукариот

Все мембраны образуют липопротеидные плёнки, они имеют двойной слой липидов. Одна из важнейших функций биомембраны – барьерная. Например, мембрана пероксисом защищает цитоплазму от опасных для клетки пероксидов. Ещё одно важное свойство биомембраны – избирательная проницаемость.

Глиоксилатный цикл

Условно анаплеротическим можно назвать глиоксилатный цикл.

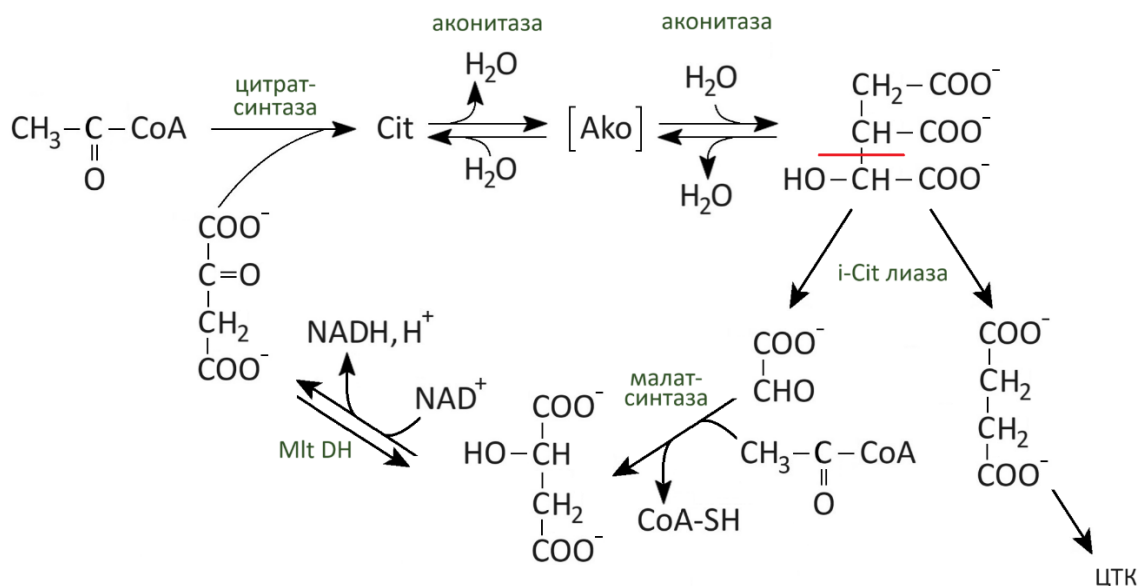


Рис. 5.4. Глиоксилатный цикл

Пируват превращается в ацетил кофермент А и встречается с оксалоацетатом. Цитратсинтаза производит цитрат, аконитаза превращает его в изоцитрат. Затем вместо потери двуокиси углерода, данная молекула расщепляется. Под действием фермента **изоцитратлиаза** четырёхуглеродный фрагмент в виде сукцината удаляется (идёт в ЦТК), и остается соединение с 1 карбонильной и 1 карбоксильной группой – **глиоксилат**. В реакцию вступает вторая молекула ацетилкофермента А, под действием фермента **малатсинтаза** происходит ещё одна конденсация и получается малат. Дальше под действием малатдегидрогеназы NAD^+ восстанавливается до $NADH$ (как в ЦТК), получается оксалоацетат, цикл замыкается.

Глиоксилатный цикл протекает исключительно у растений, наиболее активно – в момент проращивания семян. В семенах запасено много масла, но из углеводов сложно что-то строить. В цитозоле капли масла под действием разнообразных липаз превращаются в жирные кислоты, которые через специальные переносчики транспортируются через мембрану и попадают в глиоксисому. Здесь из жирных кислот получается ацетилкофермент А, 2 молекулы которого попадают в глиоксилатный цикл.

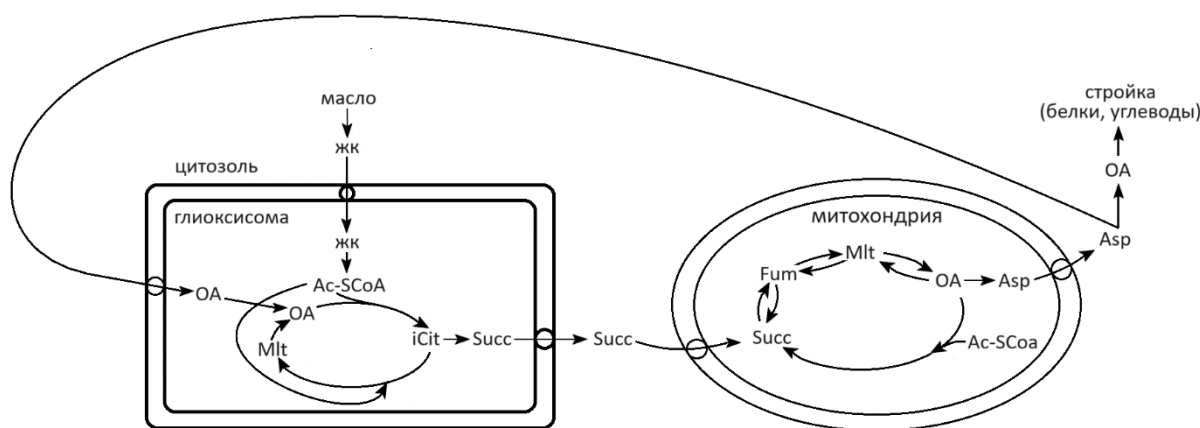


Рис. 5.5. Связь глиоксилатного цикла и ЦТК

В глиоксилатном цикле выделяется сукцинат, который выходит в цитозоль и заходит в митохондрию, где вовлекается в ЦТК. Оксалоацетат, образующийся в ЦТК, превращается в аспарат и выходит в цитозоль. Отсюда аспарат частично проходит через мембрану глиоксисомы, превращается обратно в оксалоацетат и снова вовлекается в глиоксилатный цикл, а частично расходуется на построение белков и углеводов

Таким образом, глиоксилатный цикл протекает наряду с циклом трикарбоновых кислот. Сущность цикла Кребса в том, что он ведёт к CO_2 и H_2O и необходим для образования энергии. А глиоксилатный цикл производит и поставляет в ЦТК сукцинат, поэтому к какой-то степени его можно отнести к анаэробным реакциям.

ЭТЦ

Самое высокоэнергетическое соединение, вышедшее из ЦТК – это NADH, который вступает в поток окислительно-восстановительных реакций между пространственно-сближенными молекулами на внутренней митохондриальной мембране (рис. 5.6). По мере приближения к кислороду стандартные окислительно-восстановительные потенциалы переносчиков электронов становятся всё более положительными. Этого и следует ожидать, поскольку электроны всегда стремятся переходить от электроотрицательных систем к электроположительным, что вызывает снижение свободной энергии. Это свидетельствует о том, что реакции протекают самопроизвольно.

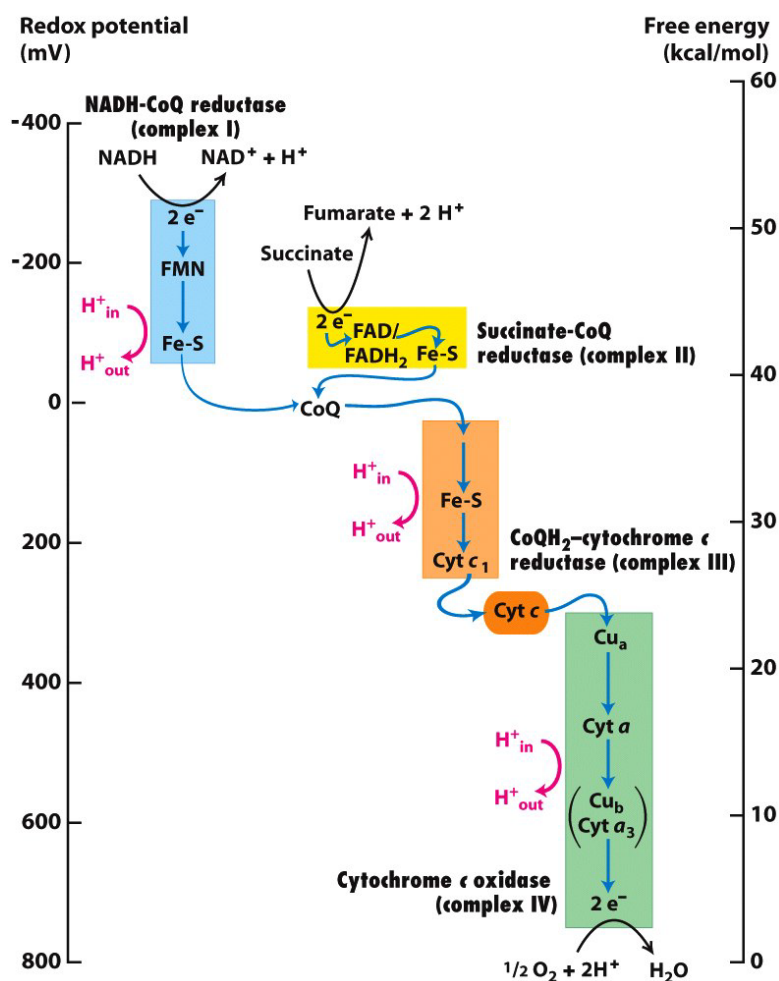


Рис. 5.6. Электрон-транспортная цепь

Комплекс I состоит из фермента NADH-дегидрогеназа (NADH-убихинон-оксидоредуктаза). У этого фермента есть 2 типа переносчиков: флавинмононуклеотид (FMN) и некоторое количество железо-серных кластеров. Это одноэлектронное окисление-восстановление, только один из атомов железа меняет свою степень окисления (восстанавливается до Fe²⁺ окисляется до Fe³⁺).

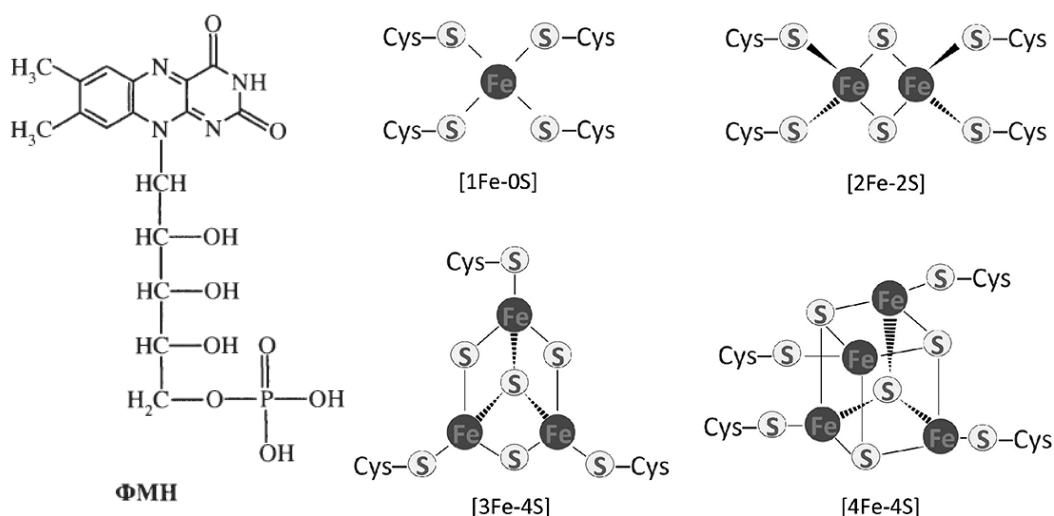


Рис. 5.7. Структура переносчиков: ФМН и железо-серные кластеры

Далее электроны переносятся на кофермент Q, или убихинон (название отражает универсальное распространение этого кофермента: он найден практически во всех клетках). Убихинон – это жирорастворимый хинон с очень длинной изопреноидной боковой цепью. Когда восстановительные эквиваленты переходят от восстановленной NADH-дегидрогеназы (E-FMNH₂) через железо-серные кластеры на убихинон, последний восстанавливается сначала в интермедиат семихиноновый радикал, а затем в стабильный убихинол (QH₂) с одновременной регенерацией окисленной формы NADH-дегидрогеназы.

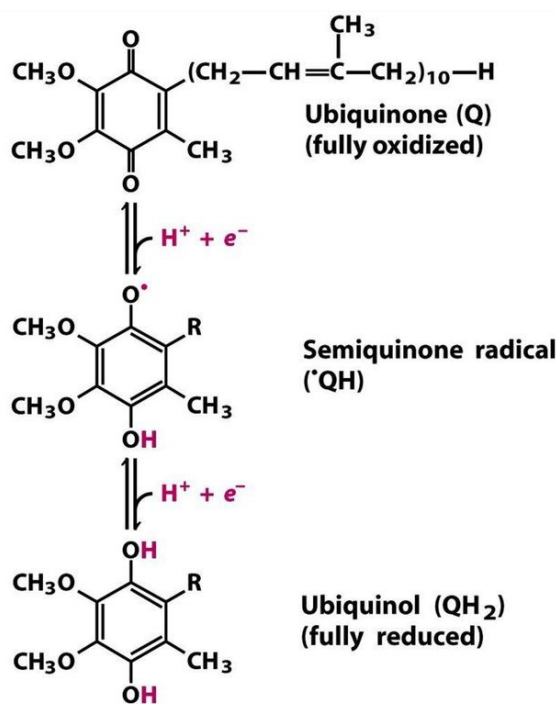


Рис. 5.8. Три формы кофермента Q

Комплекс III состоит из цитохромов b и c. Цитохром b принимает электроны от убухинона и передаёт их цитохрому c1, который в свою очередь передаёт их цитохрому c.

Цитохромы – это железосодержащие белки. Существует 3 класса цитохромов: a, b и c, которые различаются по спектрам поглощения. У каждого цитохрома в восстановленной форме обнаруживаются три чёткие полосы поглощения в видимой части спектра (рис. 5.9).

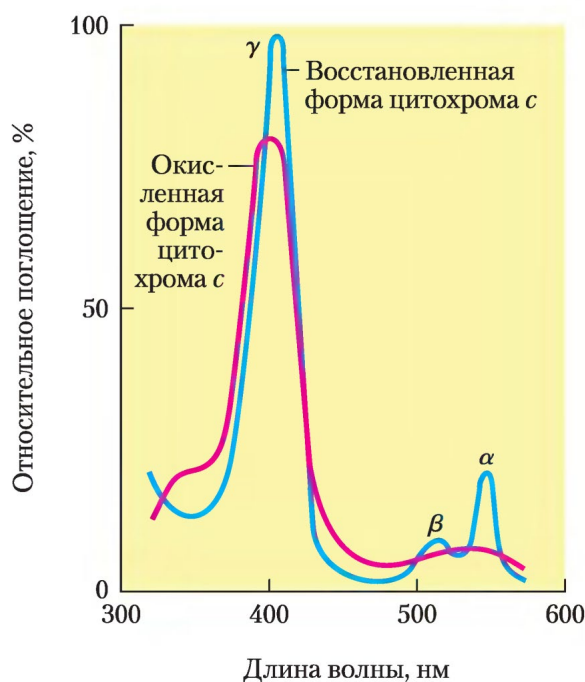


Рис. 5.9. Спектры поглощения цитохрома c в окисленной и восстановленной форме

Комплекс IV включает цитохром a+a₃, называемый также цитохромоксидазой, поскольку он переносит электроны прямо на кислород и тем самым завершает процесс переноса. Данный цитохром отличается от других. В его состав входят две молекулы прочно связанного гема A, отличающегося от протогема гемоглобина наличием у его порфиринового кольца длинной углеводородной боковой цепи. Кроме того, в нём имеются также два атома меди, играющие важную роль. Присоединив электроны, поступившие от цитохрома c, и перейдя таким образом в Fe(II)-форму, компонент a цитохрома a₃ передаёт затем эти электроны цитохрому a₃. Восстановленный цитохром a₃ в свою очередь передаёт электроны на молекулярный кислород (O₂). В этом процессе вместе с двумя железопорфириновыми группами участвуют два связанных атома меди, что сопровождается обратимым изменением их валентности [Cu(I)-Cu(II)]. Этот сложный процесс является важным этапом переноса электронов, поскольку здесь четыре электрона должны быть переданы почти одновременно на O₂ для того, чтобы образовались две молекулы H₂O (четыре H⁺-иона, которые тоже для этого необходимы,

поступают из водной среды). Из всех переносчиков цепи переноса электронов только цитохром $a+a_3$ способен вступать непосредственно в реакцию с кислородом.

Комплекс II включает сукцинатдегидрогеназу, под действием которой сукцинат превращается в фумарат, а E-FAD в E-FADH₂. FAD – кофактор, то есть он никуда не уходит от фермента, а значит, чтобы передать восстановительный эквивалент в ЭТЦ, то сукцинатдегидрогеназа должна быть её частью. Сукцинатдегидрогеназа передаёт электроны на убихинон.

Энергетика ЭТЦ. Синтез АТФ

В дыхательной цепи имеется три участка, в которых перенос электронов сопровождается относительно большим снижением свободной энергии (рис. 5.10). Эти этапы поставляют свободную энергию для синтеза АТФ.



Рис. 5.10. Поток электронов и энергетические соотношения в дыхательной цепи

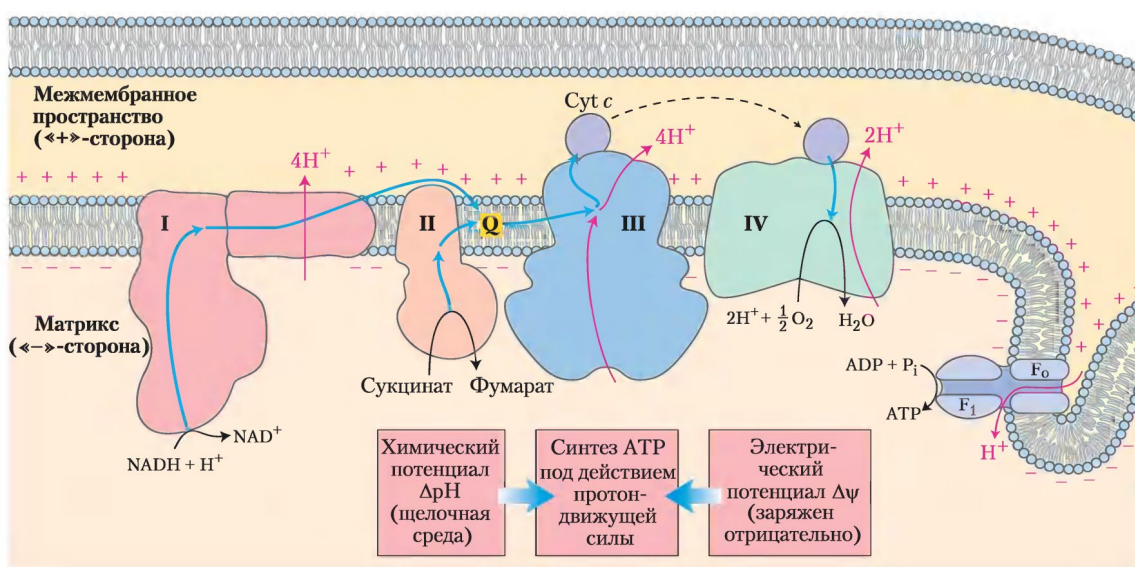


Рис. 5.11. Потoki электронов и протонов через дыхательную цепь митохондрий

Согласно хемиосмотической теории, электроны от NADH и других окисляемых субстратов проходят через цепь переносчиков электронов, асимметрично расположенных во внутренней мембране митохондрий. Перенос электронов сопровождается переносом (выкачиванием) через мембрану протонов из матрикса в межмембранное пространство, что приводит к возникновению электрохимического градиента потенциалов. Внутренняя мембрана непроницаема для протонов. Они могут вернуться в матрикс только через специальные каналы в АТР-синтазе. Переход ионов H^+ из зоны с более высокой концентрацией в зону с более низкой концентрацией сопровождается высвобождением свободной энергии, за счет которой происходит синтез АТР.

Фермент АТР-синтаза в процессе непрерывного синтеза АТР должен претерпевать циклические конформационные изменения, переходя из формы, способной прочно связывать АТР, в форму, обеспечивающую освобождение АТР. Как показали биохимические и рентгеноструктурные исследования, особенности строения АТР-синтазы позволяют совершать эти альтернативные превращения.

На рис. 5.12 представлена структура АТР-синтазы. Две b_2 -субъединицы компонента F_0 прочно связаны с α - и β -субъединицами компонента F_1 , поэтому положение «головки» компонента F_1 в мембране строго фиксировано. В мембрану погружена цилиндрическая структура из c -субъединиц; она связана со стержнем из $\alpha\beta$ -субъединиц через специальное соединение, образованное γ - и δ -субъединицами. Вся субъединичная система комплекса F_1 похожа на букву Г.

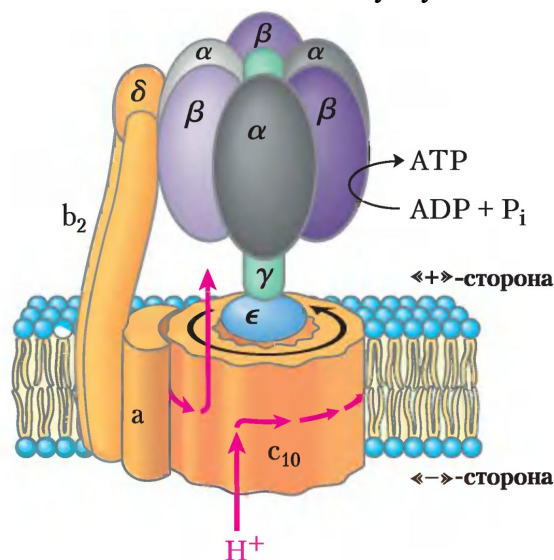


Рис. 5.12. Модель структуры АТР-синтазы

Компонент F_1 АТР-синтазы имеет три неэквивалентных адениннуклеотидных центра связывания, расположенных между парами α - и β -субъединиц. В какой-то момент один из этих центров находится в АТР- β -конформации, то есть способен прочно связывать АТР, другой – в АDP- β -конформации, образующей с лигандом

слабые связи, третий центр имеет пустую β -конформацию, благоприятную для разрыва связей и высвобождения продукта. В результате поворотов вокруг центрального стержня под действием протон-движущей силы γ -субъединица поочередно касается каждой пары $\alpha\beta$ -субъединиц в компоненте F_1 , что вызывает одновременное изменение конформаций трёх активных центров. Центр с АТФ- β -конформацией переходит в пустую β -конформацию, благодаря чему происходит диссоциация АТФ. Центр с АДФ- β -конформацией переходит в АТФ- β , что приводит к образованию АТФ из АДФ и фосфата. Центр с пустой β -конформацией преобразуется в центр с АДФ- β -конформацией, где происходит связывание АДФ и фосфата, поступивших из раствора.

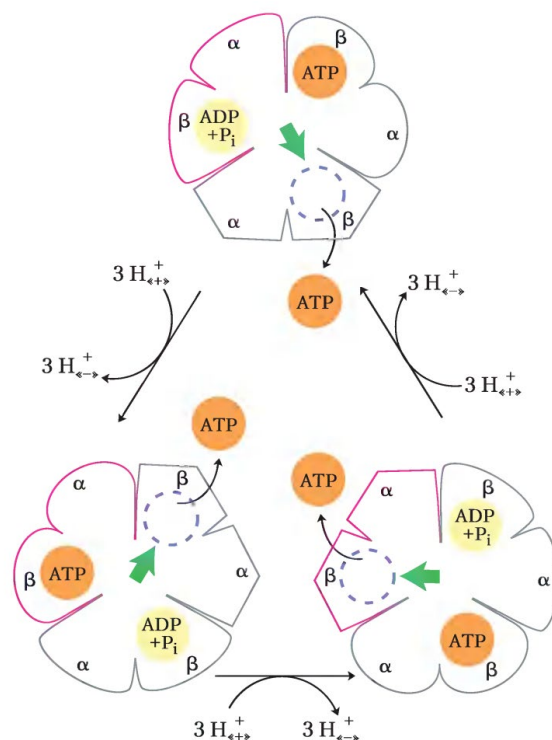


Рис. 5.13. Вращательный механизм изменения селективности активных центров

Согласно предложенному механизму (рис. 5.13), который получил экспериментальное подтверждение, по меньшей мере в двух из трёх каталитических центров должны протекать разные процессы. А именно, молекула АТФ не может освободиться из одного центра, пока в другой не поступят АДФ и фосфат.

Лекция 6. Q-цикл. Челночные системы

Q-цикл

В ЭТЦ есть набор переносчиков, которые сгруппированы в комплексы. Они находятся в мембране и сами никуда не двигаются. Есть 2 участника ЭТЦ, которые не относятся к комплексам, а сочленяют их: убихинон и цитохром с. Убихинон находится внутри мембраны за счёт длинного жирорастворимого изопреноидного «хвоста».

На поверхности мембраны, обращенной к матриксу, атомы водорода формируются из протонов, забираемых из матрикса, и электронов, поставляемых цепью. Эти атомы образуются на молекуле убихинона Q, который превращается в восстановленную форму QH₂. Последняя диффундирует к противоположной стороне мембраны, где события протекают в обратном направлении: электроны отщепляются от атомов водорода, а образующиеся протоны уходят наружу. Иными словами, Q восстанавливается на одной стороне мембраны, движется в виде QH₂ к другой, там окисляется до Q и возвращается обратно. Дело в том, что Q участвует в двух редокс-парах, разнесённых по обе стороны мембраны и способных передавать атомы водорода через мембрану с одной поверхности на другую. Как восстановление Q, так и окисление QH₂ катализируют специализированные белки. Вся эта система получила название Q-цикла.

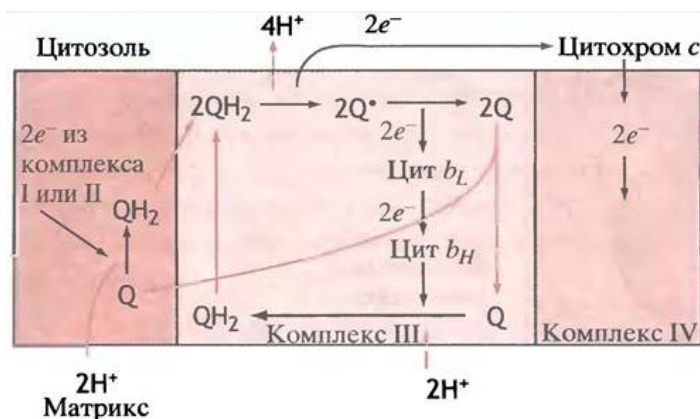


Рис. 6.1. Схема Q-цикла

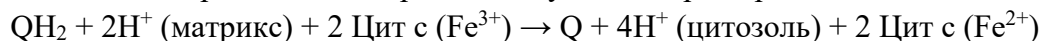
Полная схема Q-цикла включает два разных циклических процесса, каждый из которых приводит к выбросу из мембраны 2 протонов. В мембране существует стационарный общий фонд Q и QH₂. В левой части рис. 6.1 показано, что восстановление Q до QH₂ комплексами I и II сопровождается поглощением 2 протонов из матрикса митохондрий. Образовавшийся QH₂ мигрирует к внешней поверхности мембраны, где отдаёт 1 электрон на восстановление цитохрома с, переносящего его к комплексу IV (цитохром с, подобно убихинону, подвижен, но не в мембране, а в воде и располагается с наружной стороны мембраны, как и участок комплекса IV, акцептирующий электрон). Одновременно с потерей электрона QH₂ отдаёт во

внешнюю среду 2 протона и превращается в анион-радикал семихинона Q*. Последний далее снова отдаёт 1 электрон, но уже не цитохрому c, а цитохрому b.

Молекула QH₂, покинувшая комплекс II, была окислена, 2 электрона (по одному) были переданы от неё цитохромам c и b, а 2 атома водорода в виде протонов вышли наружу во внемитохондриальное пространство. Убихинон поступает в общий фонд этого вещества в мембране. Другая половина истории начинается с того, что вторая молекула QH₂ подвергается точно такому же окислению, что и первая, отдавая 2 протона в окружающую среду. Таким образом, после окисления 2 молекул QH₂ 2 электрона передаются комплексу IV через цитохром c, а ещё 2 электрона – цитохрому b. Далее электроны с одного гема, входящего в состав цитохрома b, переходят на другой гем, связанный с тем же белком, но обладающий большим редокс-потенциалом (или, что, то же самое, меньшей энергией). Этот перенос эквивалентен переходу электронов на другую, обращённую к матриксу сторону мембраны. Здесь они расходуются на восстановление Q в QH₂, при этом атомы водорода в виде протонов извлекаются из матрикса. Далее QH₂ возвращается к внешней стороне мембраны, цикл замыкается, и эта «карусель» готова к очередному обороту.

Для простоты и ясности на рис. 6.1 показано, будто каждая из изображенных молекул последовательно обегает цикл, подобно детали, движущейся по автоматической линии станков. В действительности же каждая из окислительно-восстановительных реакций протекает с молекулой, произвольно выбранной из общего фонда.

Если рассматривать только процессы, протекающие в пределах комплекса III, то их можно описать уравнением, согласно которому окисление одного QH₂ сопровождается выбросом из мембраны не двух, а четырёх протонов:



Баланс по АТФ, ADP и Pi

В большинстве эукариотических клеток синтез основного количества АТФ происходит внутри митохондрий, но основные потребители АТФ расположены вне её. Следовательно, должны существовать механизмы, обеспечивающие поступление ADP и фосфата в матрикс митохондрий и выведение АТФ из него наружу. Эти заряженные молекулы сами никак не могут сами пересечь липидный бислой. Существует так называемая АТФ-ADP-транслоказа, которая обменивает внутримитохондриальный АТФ на ADP, находящийся вне митохондрии (рис. 6.2).

Откуда берется энергия для ADP-АТФ обмена? Мы уже упоминали о том, что выкачивание протонов из митохондрий создаёт на внутренней мембране не только градиент pH, но и разность электрических потенциалов (минус – внутри). Молекула АТФ несёт четыре отрицательных заряда, а ADP – только три. Нетрудно видеть, что ADP-АТФ обмен эквивалентен переносу одного отрицательного заряда из митохондрии наружу, то есть по градиенту потенциала. Другими словами, движущей силой такого

обмена является мембранный потенциал, возникающий в результате переноса электронов. Расчёт показывает, что на ADP-ATP-обмен расходуется около четверти свободной энергии, высвобождающейся при транспорте электронов по цепи. Другие транспортные системы также могут приводиться в действие электрохимическим градиентом. К их числу, например, относится транслоказа, обеспечивающая поступление в митохондрии фосфата, необходимого для синтеза АТФ (рис. 6.2).

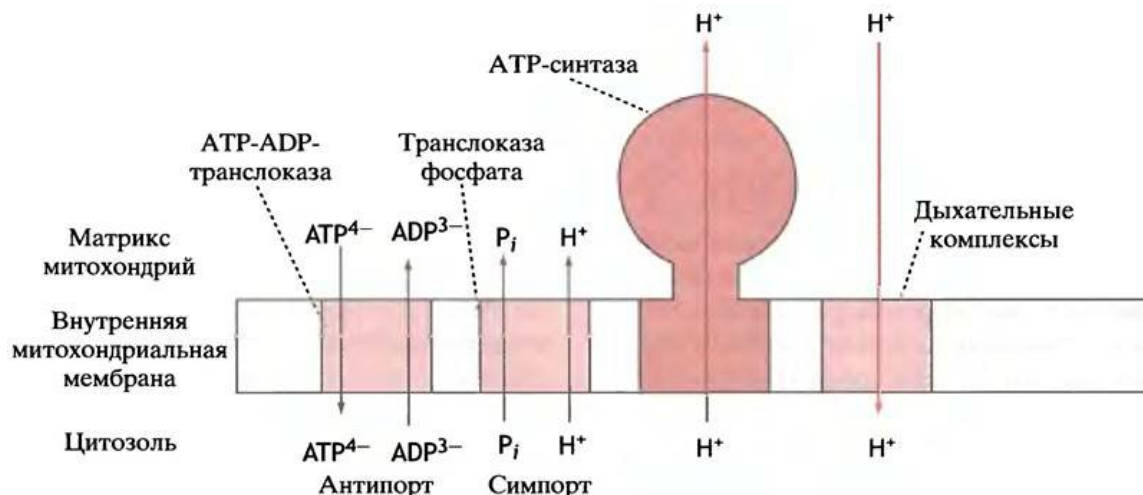


Рис. 6.2. Трансмембранный транспорт в митохондриях, связанный с синтезом АТФ

Если исходить из допущения, что ADP и фосфат уже находятся в матриксе, то каждой синтезированной молекуле АТФ соответствует прохождение через синтазу 3 протонов. ADP-ATP-обмен в чистом виде создаёт на мембране электрический потенциал, поскольку заряды у этих молекул отличаются на единицу. Чтобы такой обмен стал электронейтральным, в митохондрию должно поступать эквимоллярное количество протонов, которые затем предстоит выкачать обратно. Поэтому, с учётом «транспортных расходов», синтез 1 молекулы АТФ (доступной для использования в цитоплазме) сопряжён с переносом 4 протонов из матрикса наружу.

Каждой паре электронов, перенесённых от NADH на кислород, соответствует 10 протонов, перекачанных из митохондриального матрикса. Таким образом, окисление 1 молекулы NADH, уже находящейся внутри митохондрии, должно привести к синтезу 2,5 молекул АТФ, а окисление 1 молекулы FADH₂ (что эквивалентно молекуле сукцината) – к синтезу 1,5 молекул АТФ. Раньше полагали, что синтезируются соответственно, три и две молекулы АТФ. Эти величины принято называть отношениями P/O, поскольку перенос 2 электронов эквивалентен восстановлению 1 атома кислорода.

Регуляция Q-цикла

Главная регуляция осуществляется через потребление кислорода, которое в свою очередь регулируется концентрацией ADP.

Энергетический «заряд» клетки описывается формулой:

$$Z = \frac{1/2 [ADP] + [ATP]}{[AMP] + [ADP] + [ATP]}$$

Клетка себя чувствует хорошо, когда $Z \geq 0,95$, то есть всё преимущественно в виде АТФ. Когда концентрация АДФ возрастает, это служит существенным регулятором к включению всех этапов синтеза. При этом резко увеличивается потребление кислорода и начинается сжигание.

Коэффициент аэробности – это отношение потребления кислорода в присутствии АДФ к потреблению кислорода в норме.

Локализация процессов в клетке

В цитозоле идёт весь процесс гликолиза. Пируват получается в цитозоле, после чего при помощи специальной транспортной системы он переносится в матрикс, где работает пируват ДН-комплекс. Здесь же в матриксе локализован весь ЦТК, кроме аконитазы и Succ-DH (поскольку она должна быть частью ЭТЦ). На внутренней митохондриальной мембране находится ЭТЦ, аконитаза, Succ-DH, АТФ-синтаза и транслоказа.

ЦИТОЗОЛЬ: весь гликолиз

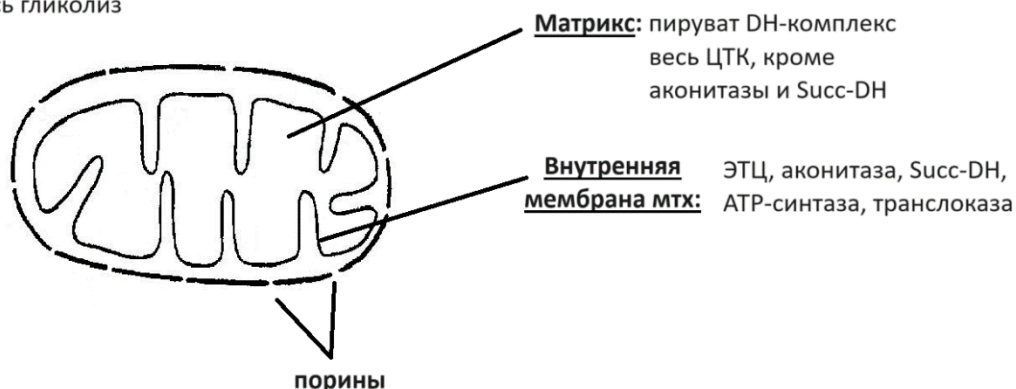


Рис. 6.3. Локализация изученных процессов

Во внешней митохондриальной мембране есть порины – белки, которые пересекают клеточную мембрану и действуют как поры, через которые могут диффундировать молекулы. Порины образуют поры, которые функционируют как молекулярные сита, опосредуя диффузию небольших соединений, величина молекул которых не превышает диаметр этих пор. Это способствует локализации всех биомолекул в нужных местах.

Челночные системы для переноса NADH

NADH-дегидрогеназа внутренней митохондриальной мембраны может присоединять электроны только от NADH, находящегося в матриксе. Внутренняя митохондриальная мембрана непроницаема для наружного NADH, который находится

в цитозоле. Для переноса электронов предусмотрены особые челночные системы, переносящие восстановительные эквиваленты от цитозольного NADH в митохондрии непрямым путём.

Самая активная из них – это **малат-аспартатная челночная система**, действующая в митохондриях печени, почек и сердца. Она переносит электроны от цитоплазматического NADH к митохондриальному NAD⁺. Это приводит к образованию митохондриального NADH, который далее окисляется в электронтранспортной цепи.

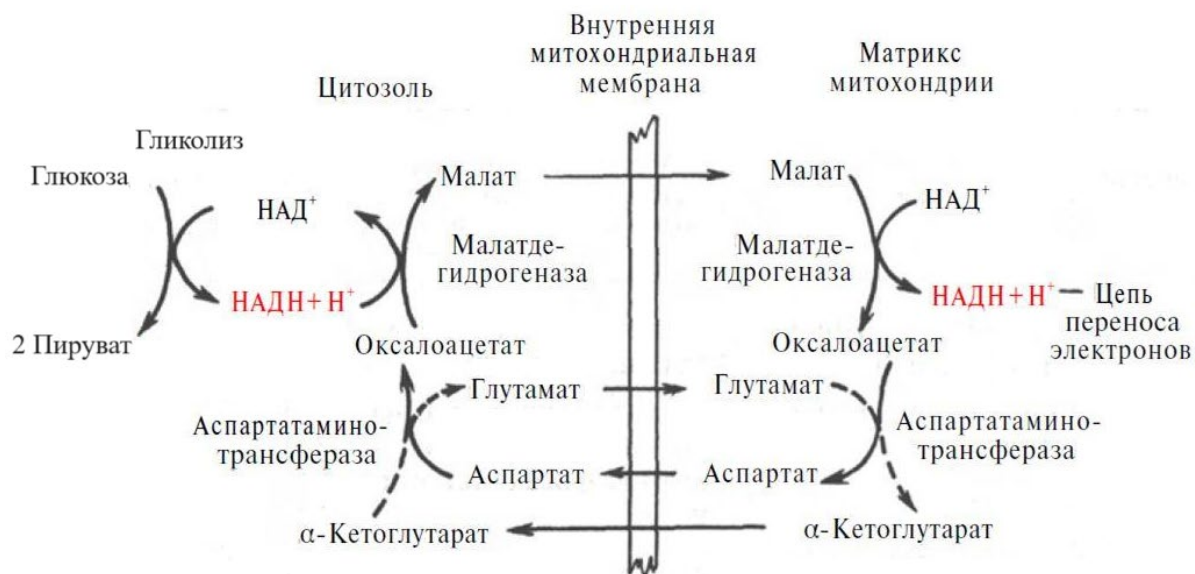


Рис. 6.4. Малат-аспартатная челночная система

1. Цитозольный NADH передаёт два восстановительных эквивалента на цитозольный оксалоацетат, что приводит к образованию малата.
2. Несущий восстановительные эквиваленты малат переносится через внутреннюю мембрану при помощи малат-α-кетоглутаратной транспортной системы.
3. В матриксе малат передаёт два восстановительных эквивалента на матриксный NAD⁺. Образовавшийся в матриксе NADH окисляется электронами дыхательной цепи митохондрий. Продукт малатдегидрогеназной реакции оксалоацетат не способен пройти через мембрану, чтобы вернуться в цитозоль.
4. Под действием фермента трансаминазы (аспартатаминотрансферазы) оксалоацетат превращается в аспартат (рис. 6.5).

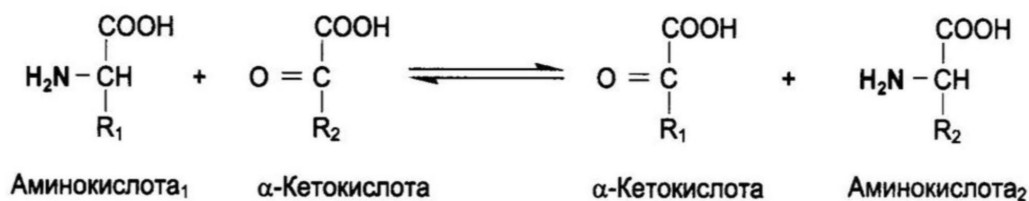


Рис. 6.5. Трансаминирование

5. Аспартат может быть перенесён через мембрану глутамат-аспартатной транспортной системой.
6. В цитозоле оксалоацетат регенерируется и начинается новый оборот челночного цикла.

В скелетных мышцах и в мозге перенос восстановительных эквивалентов от NADH осуществляется челночной системой другого типа. Это так называемая **глицеролфосфатная челночная система**. Она отличается от описанной выше малат-аспартатной челночной системы конечным этапом своего действия. Отличие состоит в том, что восстановительные эквиваленты передаются ею в дыхательную цепь и на убихинон, то есть в комплекс III, а не в комплекс I.

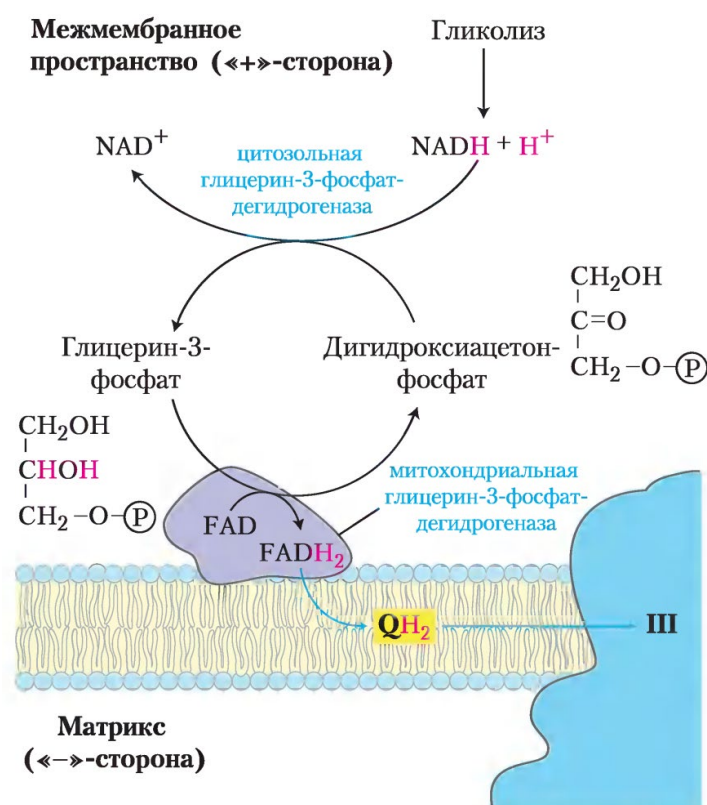


Рис. 6.6. Глицеролфосфатная челночная система

Глицеролфосфатная челночная система использует дигидроксиацетонфосфат (ДГАФ), образующийся при расщеплении фруктозо-1,6-дифосфата альдолазой. В цитоплазме электроны от NADH передаются на ДГАФ с образованием глицерин-3-фосфата. Это происходит при участии фермента глицерин-3-фосфатдегидрогеназы (здесь фермент также назван по обратной реакции). Глицерин-3-фосфат достигает внутренней мембраны митохондрий (вспомним, что внешняя мембрана для большинства низкомолекулярных веществ не является преградой), где глицерин-3-фосфатдегидрогеназа, встроенная в мембрану (простетической группой фермента служит FAD), передаёт электроны с глицерин-3-фосфата в митохондриальную

электронтранспортную цепь. Образующийся при этом ДГАФ возвращается в цитоплазму, замыкая таким образом челночный цикл. Необходимо отметить, что переносчик электронов глицерин-3-фосфат не проникает в матрикс митохондрий. Его задача – перенести электроны с цитоплазматического NADH на митохондриальную электронтранспортную цепь.

Механизм взаимопревращения оксалоацетата и аспартата, в отличие от глицеролфосфатного, обратим и поставляет NADH в митохондрии лишь при условии, что отношение $NADH/NAD^+$ в цитоплазме выше, чем в митохондриальном матриксе.

Таким образом, молекулы NADH, образовавшиеся в ходе гликолиза, отдают свои пары электронов либо внутримитохондриальному NAD^+ , либо митохондриальному FAD, в зависимости от того, какой челночный механизм преобладает в данной клетке. Благодаря этой неопределенности одной цитоплазматической молекуле NADH отвечает синтез от 1,5 до 2,5 молекул АТФ.

При окислении молекулы глюкозы до CO_2 и H_2O выход молекул АТФ из расчёта на полностью окисленную молекулу субстрата составляет от 30 до 32 молекул в зависимости от того, какой тип челнока используется для цитоплазматического NADH.

Откуда берутся эти значения?

Некоторое количество АТФ синтезируется в ходе субстратного фосфорилирования: 2 молекулы АТФ поставляет гликолиз (продуцируются 4, но 2 расходуются) и ещё 2 молекулы АТФ (у млекопитающих это GTP) образуются в цикле лимонной кислоты (из 1 молекулы глюкозы образуются 2 молекулы ацетил-СоА, запускающие два оборота цикла). Итак, в процессе субстратного фосфорилирования синтезируются всего 4 молекулы АТФ, а все остальные образуются в митохондриях с участием цепи переноса электронов.

При гликолизе в цитоплазме образуется также 2 молекулы NADH на 1 молекулу глюкозы. Их окисление увеличит выход АТФ на 3-5 молекул в зависимости от типа используемого челнока. Кроме того, в расчете на 1 молекулу глюкозы пируватдегидрогеназа производит 2 молекулы NADH, а цикл лимонной кислоты – 6 молекул NADH. Их окисление приводит к синтезу 20 молекул АТФ. Ещё 3 молекулы АТФ образуются за счет окисления $FADH_2$ при превращении сукцината в фумарат.

Суммируя все эти числа (в скобках – значения для глицерин-3-фосфатного челнока), получаем: $2 + 5(3) + 2 + 20 + 3 = 32$ (30).

Заметим, что эта величина приближительна. Точно оценить выход АТФ можно только при субстратном фосфорилировании, а соотношение между выбросом протонов и синтезом АТФ не является фиксированным.

Лекция 7. Пентозофосфатный путь

Пентозофосфатный путь можно отнести к варианту полуторного метаболизма. Это вторичный путь катаболизма глюкозы (первичный – гликолиз). Он состоит из нескольких процессов, которые связываются лишь условно, так как могут существовать один без другого. Их объединение необязательно. Пентозофосфатный путь включает окислительный и неокислительный этап (рис. 7.1). 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.

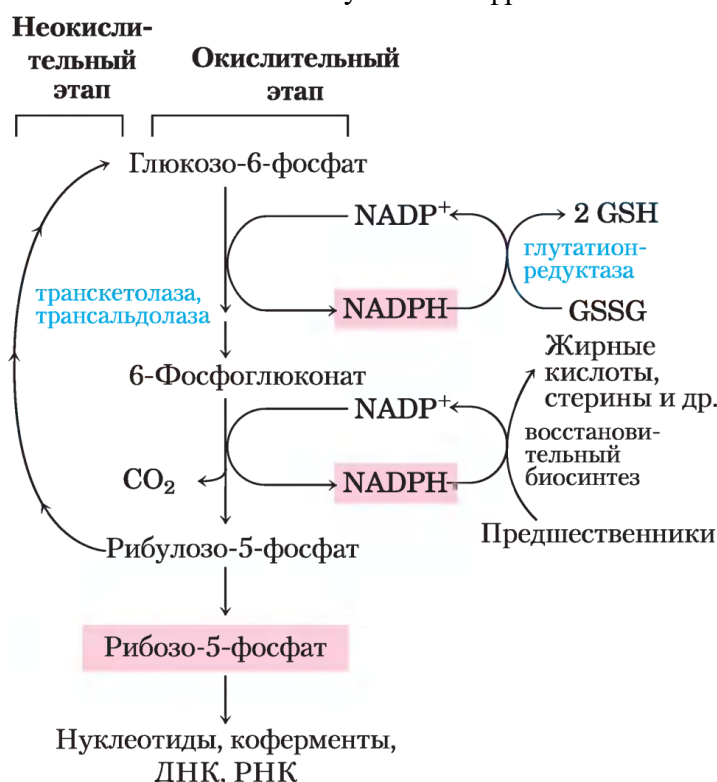


Рис. 7.1. Общая схема пентозофосфатного пути

Окислительный этап

Окислительный этап есть всегда.

1. Глюкоза за счёт АТФ под действием фермента гексокиназа превращается в глюкозо-6-фосфат.

2. Глюкозо-6-фосфат подвергается окислению под действием фермента дегидрогеназа. При этом NADP^+ восстанавливается до NADPH (NADP, а не NAD, чтобы можно было создавать отдельные центры посадки и независимо регулировать катаболический и анаболический пути). Получается фосфоглюконолактон. Реакция обратима.

3. Гидролиз лактона под действием фермента лактоназа, получается фосфоглюконовая кислота, реакция также обратима.

4. Снова $NADP^+$ восстанавливается до $NADPH$, но при этом ещё улетает CO_2 в виде карбоксильной группы. Это окислительное декарбоксилирование под действием фермента дегидрогеназа/декарбоксилаза, образуется рибулозо-5-фосфат.

5. Изомеризация (фермент – пентозофосфатизомераза), образуется рибозо-5-фосфат.

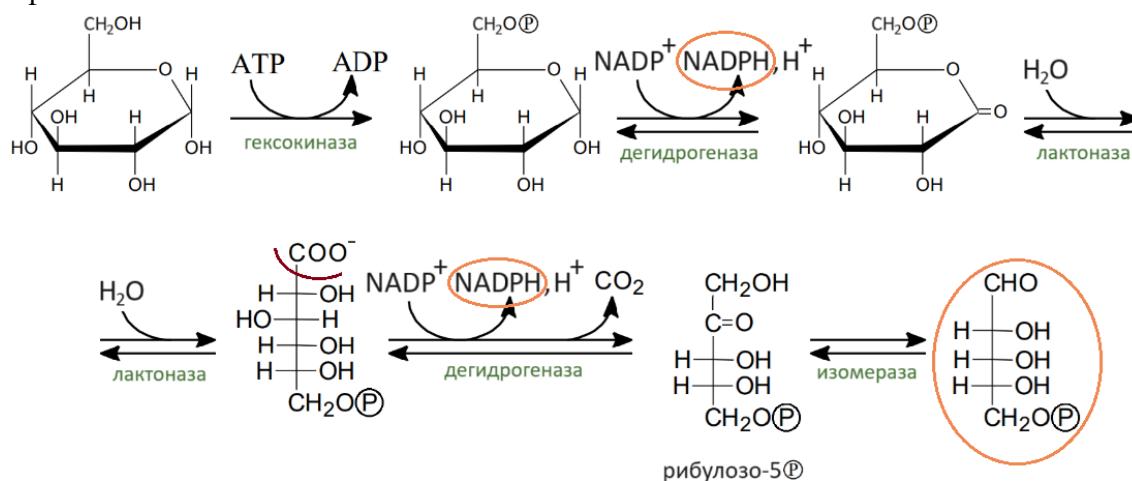


Рис. 7.2. Окислительный этап пентозофосфатного пути

Итог окислительного этапа пентозофосфатного пути – генерация 2 молекул $NADPH$ и рибозо-5-фосфата. Рибоза нам нужна в ДНК и РНК. $NADPH$ так же богат энергией, как и $NADH$, то есть по идее его можно было бы использовать для производства АТФ. Но в цитозоле $NAD^+/NADH \gg 1$, то есть NAD^+ используется в гликолизе (катаболический процесс). А $NADP^+/NADPH \ll 1$ в цитозоле, то есть $NADPH$ используется анаболических процессах (биосинтез в первую очередь жирных кислот).

Неокислительный этап

Если у клетки сбалансированы потребности в рибозо-5-фосфате и $NADPH$, то есть нужно синтезировать ДНК/РНК и что-то биосинтезировать, то всё закончится на окислительном этапе. Но бывают другие случаи. Например, жировой клетке нужно очень много $NADPH$, чтобы делать жирные кислоты, но при этом нет особой потребности в рибозо-5-фосфате. Бывает и обратная ситуация: клетка собралась делиться, ей надо много биоматериала, чтобы провести репликацию и затем транскрипцию, следовательно, требуется много рибозо-5-фосфата. А вот $NADPH$ в таком случае особо не нужен.

Неокислительный этап приходит на помощь как раз в таких случаях, когда потребности не сбалансированы. На рис. 7.4 он рассмотрен на примере потребностей жировой клетки. Возникает избыток рибозо-5-фосфата, который нужно утилизировать,

но при этом не терять, не выводить из организма. Специального метаболического пути для рибозы нет, надо вернуть её в глюкозу и по необходимости отправить в гликолиз или в гликоген. Для этого нужно 4 фермента: E1 – изомераза, E2 – эпимераза, E3 – транскетолаза, E4 – трансальдолаза.

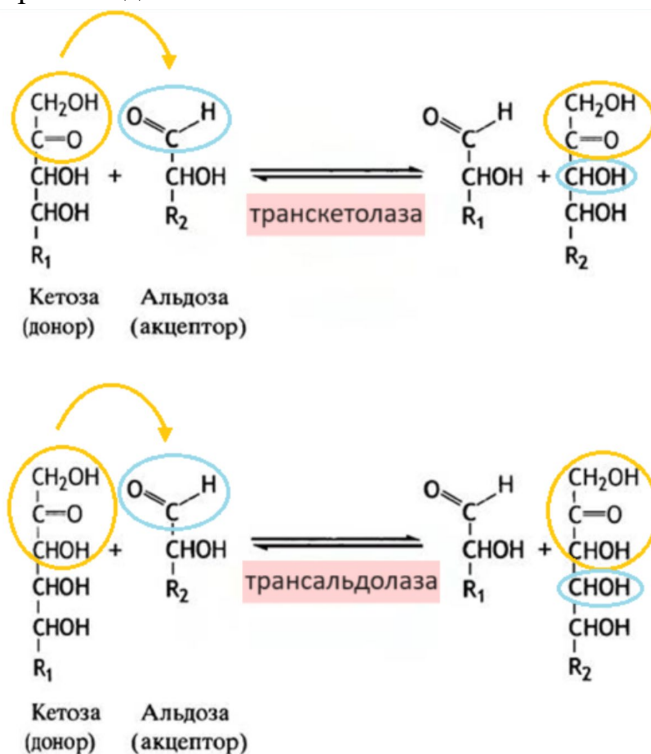


Рис. 7.3. Схема транскетолазной и трансальдолазной реакций

Транскетолаза забирает C2 фрагмент, а альдолаза снимает C3 фрагмент. Это ретроальдолные конденсации, в результате которых то, что было кетозой, становится альдозой, а то, что было альдозой, становится кетозой. Транскетолаза использует в качестве кофактора тиаминпирофосфат. Трансальдолаза не требует кофакторов кроме кальция. Наконечником действия является лизин, который атакует карбонильный углерод и делает с ним промежуточное основание Шиффа.

Подготовительные реакции:

1. Рибозо-5-фосфат под действием фермента E1 изомеризуется с образованием рибулозо-5-фосфата.
2. Эпимеризация третьего атома углерода с образованием ксилулозо-5-фосфата.

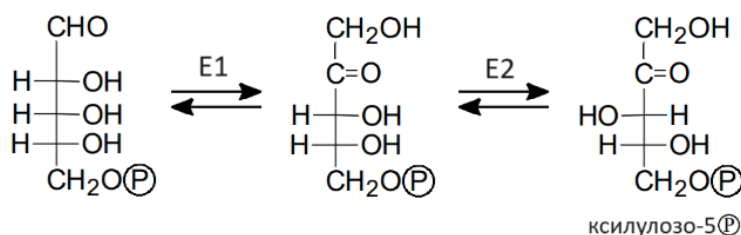


Рис. 7.4. Подготовительные реакции неокислительного этапа

Основные реакции:

1. Ксилулозо-5-фосфат (кетоза) вступает в реакцию с рибозо-5-фосфатом (альдоза). Под действием фермента E3 C2 фрагмент переносится с кетозы на альдозу с образованием 3-х углеродного и 7-и углеродного соединения: глицеральдегид-3-фосфат (GA $\text{\textcircled{P}}$) и седогептулозо-7-фосфат соответственно.

2. Под действием фермента E4 переносится C3 фрагмент, образуется фруктозо-6-фосфат (итоговый продукт) и эритрозо-4-фосфат (промежуточный продукт).

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

3. Эритрозо-4-фосфат (альдоза) вступает в реакцию с ксилулозо-5-фосфатом (кетоза). Под действием фермента E3 переносится C2 фрагмент, образуются конечные продукты: фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат (GA $\text{\textcircled{P}}$).

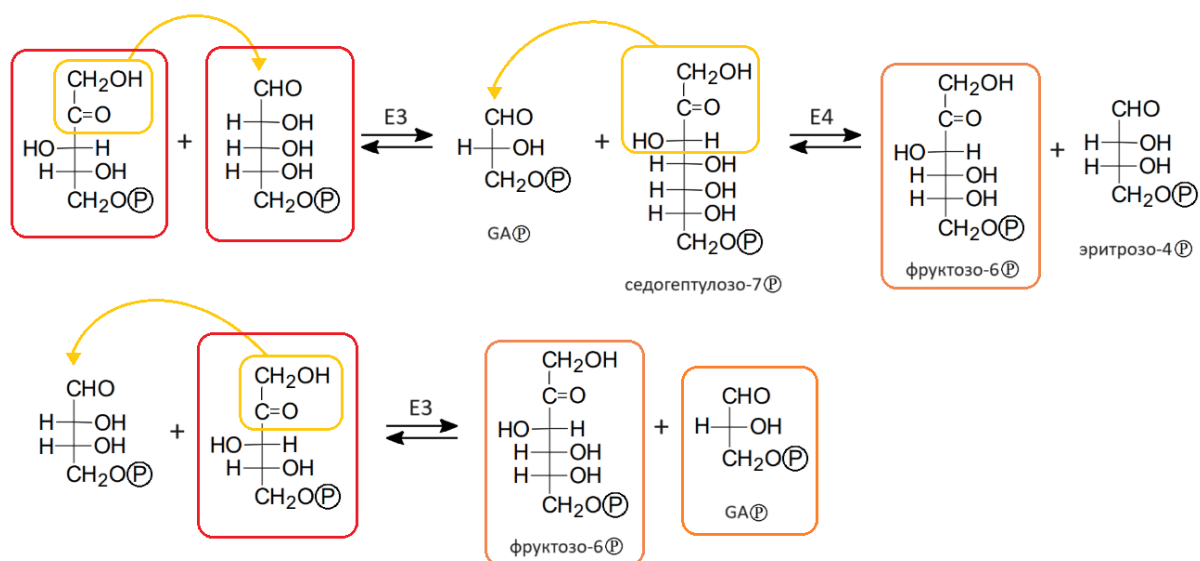


Рис. 7.5. Основные реакции неокислительного этапа

Таким образом, результатом неокислительного этапа является образование из трёх пентоз (рибозо-5-фосфат и 2 молекулы ксилулозо-5-фосфата) двух ценных продуктов (глицеральдегид-3-фосфат и 2 молекулы фруктозо-6-фосфата), которые пойдут на образование глюкозы в глюконеогенезе. То есть из 6 пентоз в глюконеогенезе будет сделано 5 гексоз. При этом на старте окислительного этапа было 6 гексоз, недостающие 6 атомов углерода улетели в виде CO_2 .

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

Для делящейся клетки не нужен NADPH, но нужно много рибозо-5-фосфата, чтобы строить ДНК. Если производить весь необходимый рибозо-5-фосфат на окислительном этапе, то будет сильное перепроизводство ненужного NADPH. Скинуть его излишки невыгодно – это пустая трата энергии. Организм решает эту задачу посредством альтернативного пути. В такой ситуации нужно забыть про

окислительный этап, взять продукты гликолиза и провести реакции неокислительного этапа в обратную сторону (все реакции обратимы).

Путь Энтнера-Дудорова

Наряду с универсальным пентозофосфатным путём, у ряда организмов (некоторых бактерий, архей и простейших эукариот) существует путь Энтнера-Дудорова.

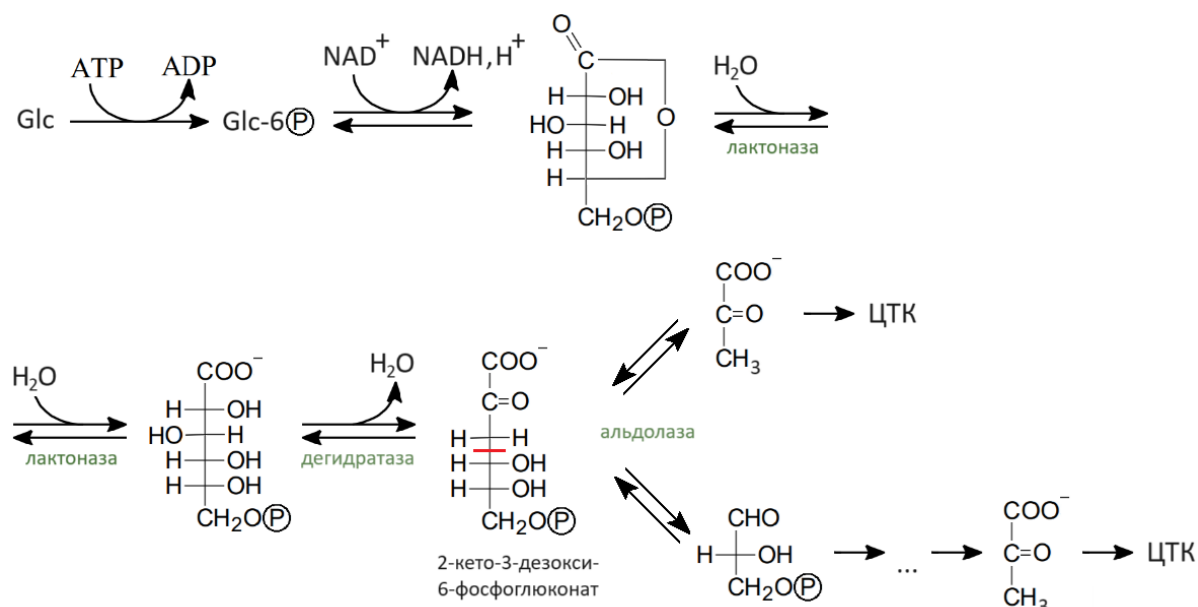


Рис. 7.6. Путь Энтнера-Дудорова

Он начинается аналогичным образом:

1. Глюкоза за счёт АТФ под действием фермента гексокиназа превращается в глюкоза-6-фосфат.
2. Глюкоза-6-фосфат окисляется трёхуглеродные до глюконолактон-6-фосфата. При этом NAD⁺ восстанавливается до NADH.
3. Под действием фермента глюконолактон-гидратаза (лактоназа) образуется 6-фосфоглюконат.
4. Под действием фермента дегидратаза образуется 2-кето-3-дезоксиглюконо-6-фосфоглюконат.
5. Под действием фермента альдолаза 2-кето-3-дезоксиглюконо-6-фосфоглюконат разрезается на 2 молекулы: пируват (через пируватдегидрогеназный комплекс сразу идёт в ЦТК) и глицеральдегидфосфат (на втором этапе гликолиза превращается в пируват, который также идёт в ЦТК).

Суммарный энергетический эффект:

АТФ +1 (-1 на первой стадии, +2 в гликолизе)

NADH +2 (+1 на второй стадии, +1 в гликолизе)

По сравнению с гликолизом этот путь менее энергетически выгоден. Он используется как средство для быстрого образования пирувата из сахаров. Для анаэробов эффективнее использовать только брожение, т.к. при совместном протекании этих двух процессов энергетический выход пути Энтнера-Дудорова сводится только к одной молекуле АТФ (NADH в процессе брожения окисляется до NAD⁺). Поэтому данный путь выгоден для аэробов, а также для организмов, которые живут в условиях большого количества альдоновых кислот, используемых в качестве источников питания.

Синтез витамина С

Синтез витамина С из глюкозы протекает в растительных организмах, но и животные организмы тоже должны его получать. Витамин С – это коллаген, препятствующий возникновению болезни цинга, которая проявляется в хрупкости костей и кожи.

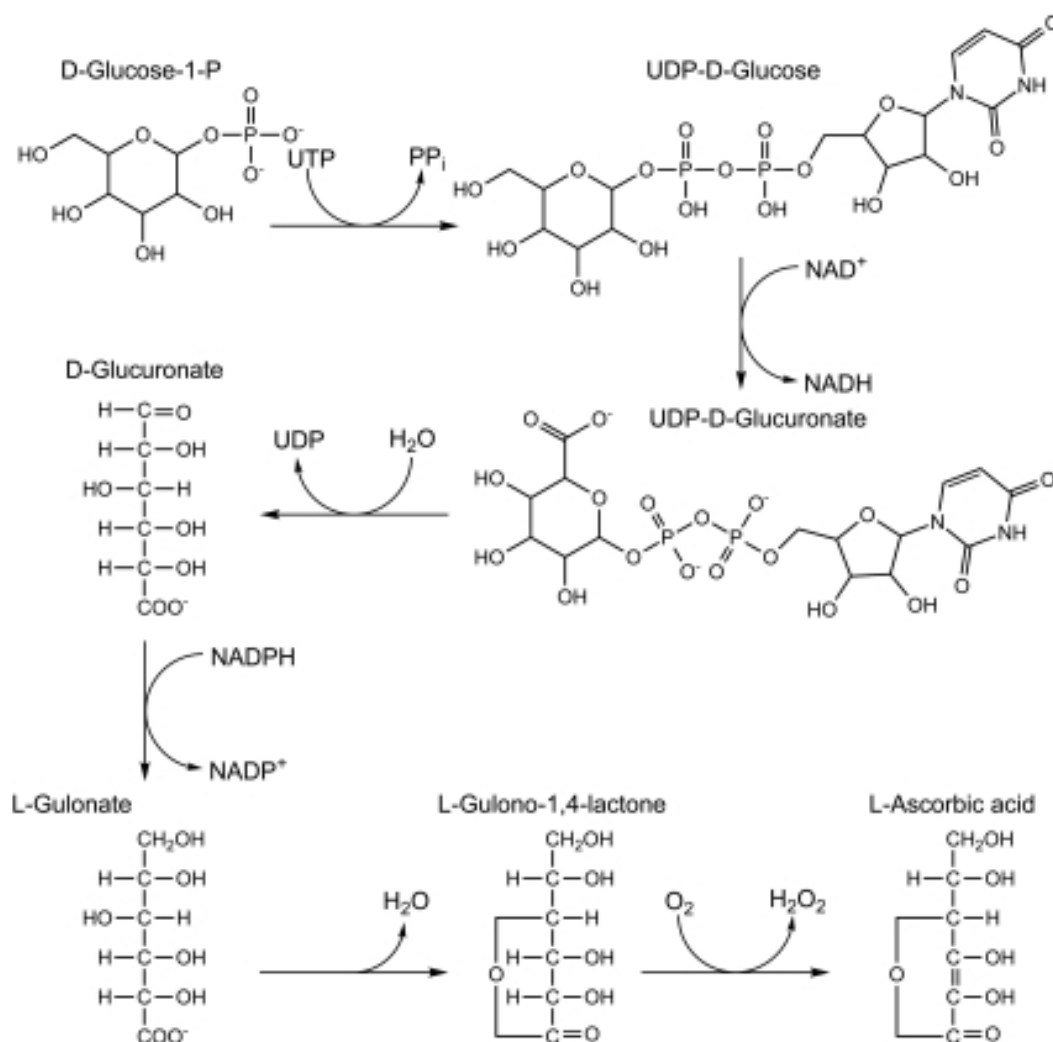


Рис. 7.7. Синтез витамина С

1. Из D-глюкозы синтезируется D-глюкозо-1-фосфат
2. Из D-глюкозо-1-фосфата синтезируется UDP-D-глюкоза (защита первого положения).
3. Четырёхэлектронное окисление 6-го положения до карбоксильной группы с образованием UDP-D-глюкуроната.
4. Снятие UDP с образованием D-глюкуроната.
5. Окисляется 6-е положение, восстанавливается первое, получается L-гулонат
6. Отщепление воды и получение L-гулонолактона
7. Образование двойной связи, получение L-аскорбиновой кислоты – витамина C



Лекция 8. Катаболизм жирных кислот

Расщепление, активация и транспорт жиров

Клетки способны получать богатые энергией жирные кислоты тремя способами:

1. из жиров, содержащихся в пище
2. из жиров, запасенных в жировой ткани – адипоцитов
3. из жиров, синтезированных в клетках с помощью синтазы жирных кислот

У животных жирные кислоты триацилглицеринов дают значительную долю окислительной энергии. Триацилглицерины пищи в тонком кишечнике превращаются в эмульсию под действием солей желчных кислот, гидролизуются кишечными липазами, всасываются эпителиальными клетками кишечника, вновь превращаются в триацилглицерины, а затем включаются в состав хиломикронов вместе со специфическими аполипопротеинами. Хиломикроны доставляют триацилглицерины к тканям, где липопротеинлипаза высвобождает из них свободные жирные кислоты для проникновения в клетки. Триацилглицерины, хранящиеся в жировой ткани, активируются гормон-чувствительной триацилглицеринлипазой. Образовавшиеся жирные кислоты связываются с сывороточным альбумином и переносятся кровью к сердцу, скелетным мышцам и другим тканям, использующим жирные кислоты в качестве источников энергии.

Вне зависимости от способа получения, жирная кислота в клетке оказывается в цитозоле. А ферменты окисления жирных кислот в клетках животных находятся в матриксе митохондрий. Жирные кислоты с цепями из 12 и менее атомов углерода попадают в митохондрии без помощи мембранных переносчиков. Состоящие из 14 и более атомов углерода (а это большинство свободных жирных кислот, получаемых с пищей или из жировой ткани) не способны пройти через митохондриальные мембраны. Вначале они должны пройти через три ферментативные **реакции карнитинового переноса**.

Оказавшись внутри клетки, жирные кислоты активируются у внешней митохондриальной мембраны превращением в ацил-СоА-тиоэфиры жирных кислот (рис. 8.1). **Первая реакция** катализируется особыми изоферментами (они специфичны к жирным кислотам с короткой, средней или более длинной углеродными цепями), которые находятся на внешней митохондриальной мембране. Это ацил-СоА-синтазы. Они активируют реакцию образования тиоэфирной связи между карбоксильной группой жирной кислоты и тиоловой группой кофермента А, что даёт образование ацил-СоА-производных жирной кислоты и сопряжено с распадом АТФ до АМФ и РРi. Реакция идёт в две стадии и включает ациладенилат жирной кислоты в качестве промежуточного соединения. Ацил-СоА-производные жирных кислот – это высокоэнергетические соединения. Их гидролиз до свободных жирных кислот и СоА сопровождается большим отрицательным изменением стандартной свободной энергии. Образование ацил-СоА- производных гораздо более выгодно благодаря гидролизу *двух*

высокоэнергетических связей в АТФ. Пирофосфат, образующийся в реакции активации, тут же подвергается гидролизу под действием неорганической пирофосфатазы, которая направляет реакцию активации в сторону образования ацил-СоА-производного жирной кислоты.

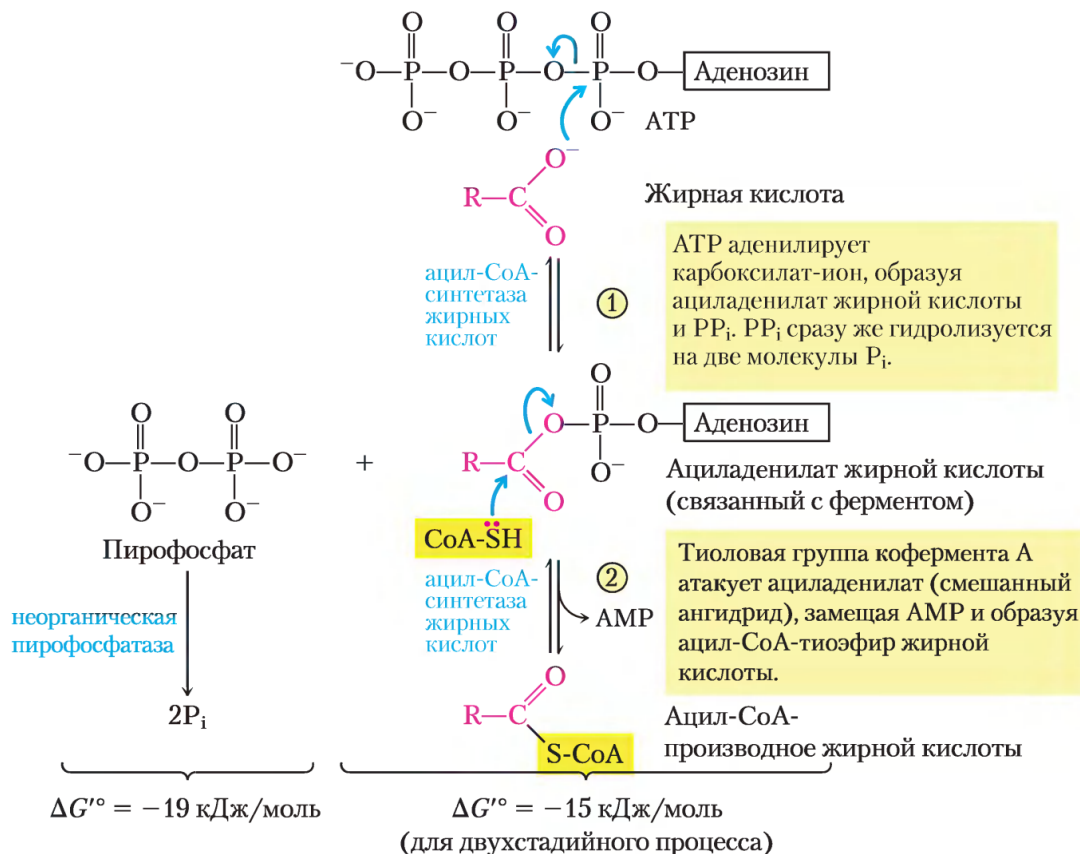


Рис. 8.1. Механизм реакции превращения жирной кислоты в ацил-СоА-производное

Жирные кислоты, предназначенные для окисления в митохондриях, временно присоединяются к гидроксильной группе карнитина (рис. 8.2), образуя ацилкарнитиновое производное, что и есть **вторая стадия** трансмембранного транспорта. Эта переэтерификация катализируется карнитинацилтрансферазой I на внешней мембране. Переход в межмембранное пространство происходит через огромные поры (образованные белком порином) на внешней мембране. После этого ацилкарнитиновый эфир жирной кислоты поступает в матрикс по механизму облегченной диффузии через ацилкарнитиновый/карнитиновый переносчик внутренней митохондриальной мембраны (рис. 8.3).

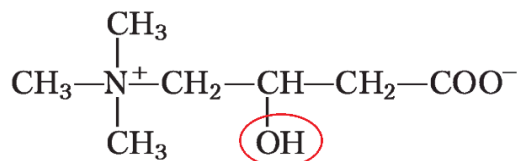


Рис. 8.2. Карнитин

Третья стадия карнитинового переноса состоит в том, что ацильная группа жирной кислоты с помощью карнитинацилтрансферазы II (т.е. ферментативно) переносится с карнитина на внутримитохондриальный кофермент А. Этот изофермент, расположенный на внутренней поверхности внутренней митохондриальной мембраны, регенерирует ацил-СоА-производное жирной кислоты и высвобождает его вместе со свободным карнитином в матрикс (рис. 8.3). Карнитин вновь проникает в межмембранное пространство через ацилкарнитиновый/карнитиновый переносчик.

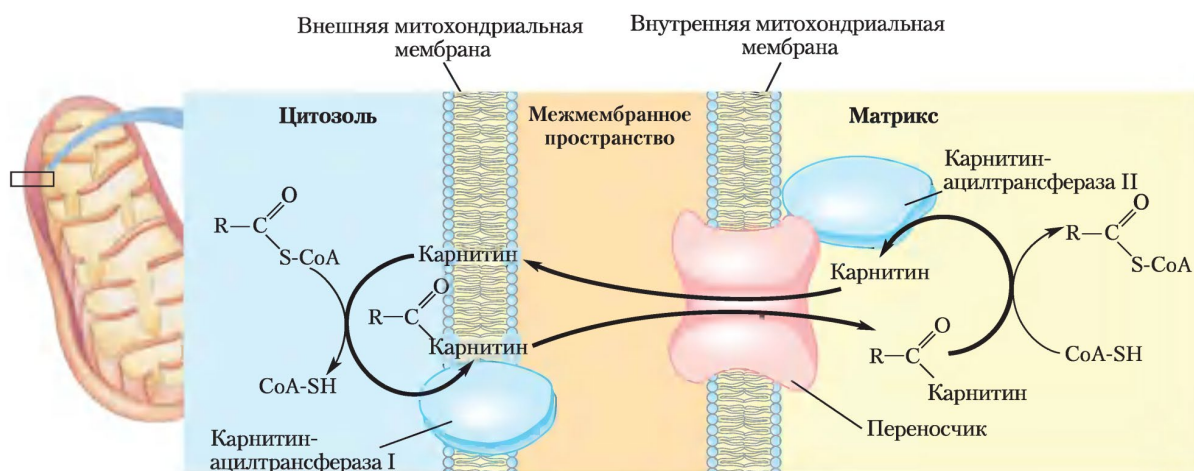


Рис. 8.3. Проникновение жирной кислоты в митохондрию

Этот трёхстадийный процесс переноса жирных кислот в митохондрии, включающий образование сложного эфира с СоА, трансэтерификацию с карнитином, после чего следует перенос и образование нового сложного эфира с СоА, связывает между собой два изолированных друг от друга пула кофермента А и ацил-СоА-производного жирной кислоты, один из которых находится в цитозоле, а другой в митохондриях.

Эти пулы выполняют различные функции. Кофермент А в митохондриальном матриксе активно используется в окислительном расщеплении пирувата, жирных кислот и некоторых аминокислот, тогда как кофермент А в цитозоле участвует в биосинтезе жирных кислот. Ацил-СоА-производное жирной кислоты в цитозольном пуле может использоваться для синтеза мембранных липидов или участвовать в переносе в митохондриальный матрикс для окисления и образования АТФ. Превращение в карнитиновый эфир направляет ацильный фрагмент жирной кислоты на путь окисления.

Опосредованное карнитином проникновение лимитирует общую скорость окисления жирных кислот в митохондриях и служит точкой регуляции. Как только ацил-СоА-производное жирной кислоты оказывается внутри митохондрии, оно подвергается действию целого ряда ферментов матрикса.

β-Окисление жирных кислот

Первая стадия β-окисления жирных кислот состоит из четырёх ферментативных катализируемых реакций (рис. 8.4, а).

Первая реакция катализируется одним из трёх изоферментов, которые называются ацил-СоА-дегидрогеназами, каждый из этих изоферментов специфичен к ацилу жирной кислоты с определённой длиной углеродной цепи:

- VLCAD – ацил-СоА-дегидрогеназа очень длинной цепи (от англ. *very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase*) действует на жирные кислоты с 12-18 атомами углерода
- MCAD – ацил-СоА-дегидрогеназа средней цепи (от англ. *medium-chain acyl-CoA dehydrogenase*) действует на жирные кислоты с 4-14 атомами углерода и
- SCAD – ацил-СоА-дегидрогеназа короткой цепи (от англ. *short-chain acyl-CoA dehydrogenase*) действует на жирные кислоты с 4-8 атомами углерода.

Эти три изофермента относятся к флавопротеинам и содержат FAD в качестве простетической группы. Электроны от ацил-СоА-производного переносятся на FAD, и восстановленная форма дегидрогеназы тут же отдаёт их переносчику электронов в дыхательной цепи митохондрий – электронпереносящему флавопротеину (ETF, от англ. *electron-transferring flavoprotein*). Катализируемое ацил-СоА-дегидрогеназой окисление аналогично дегидрированию сукцината в цикле трикарбоновых кислот. В обеих реакциях фермент прикреплен к внутренней мембране, между α- и β-атомами углерода карбоновой кислоты образуется двойная связь, в роли акцептора электронов выступает FAD. В итоге электроны поступают в дыхательную цепь и попадают на кислород, при этом синтезируется примерно 1,5 молекулы АТФ на одну пару электронов.

Во **второй реакции** под действием εноил-СоА-гидратазы по двойной связи *транс*-Δ²-εноил-СоА присоединяется вода с образованием L-стереоизомера – β-гидроксиацил-СоА (3-гидроксиацил-СоА).

В **третьей реакции** L-β-гидроксиацил-СоА дегидрируется под действием β-гидроксиацил-СоА-дегидрогеназы, образуя β-кетоацил-СоА. Этот фермент полностью специфичен к L-стереоизомеру гидроксиацил-СоА. В роли акцептора электронов выступает NAD⁺. Образующийся в реакции NADH отдаёт электроны NADH-дегидрогеназе, электронному переносчику дыхательной цепи, и как только электроны попадают на O₂, из ADP образуется АТФ.

Четвёртая реакция катализируется ацил-СоА-ацетилтрансферазой (тиолазой), которая способствует реакции β-кетоацил-СоА с молекулой свободного кофермента А для отщепления терминального двухуглеродного карбоксильного фрагмента исходной жирной кислоты в виде ацетил-СоА. Другим продуктом является тиоэфир кофермента А и жирной кислоты, теперь уже укороченный на два атома углерода. Эта реакция называется тиолизом (по аналогии с гидролизом), поскольку β-кетоацил-СоА расщепляется в реакции с тиоловой группой кофермента А.

При каждом цикле последовательных реакций β-окисления от ацил-CoA-производного длинноцепочечной жирной кислоты отщепляется одна молекула ацетил-CoA, две пары электронов и четыре протона (H⁺), укорачивая ацил на два атома углерода. После отщепления от пальмитоил-CoA одной молекулы ацетил-CoA остаётся тиоэфир кофермента A и укороченной на два углерода жирной кислоты (миристант – 14 атомов углерода). Миристоил-CoA теперь может пройти через ещё один цикл из четырёх реакций β-окисления, который в точности аналогичен первому, образуя вторую молекулу ацетил-CoA и лауроил-CoA – тиоэфир кофермента A и 12-углеродного лаурата. Чтобы окислить одну молекулу пальмитоил-CoA до восьми молекул ацетил-CoA, требуется семь оборотов цикла реакций β-окисления (рис. 8.4, б).

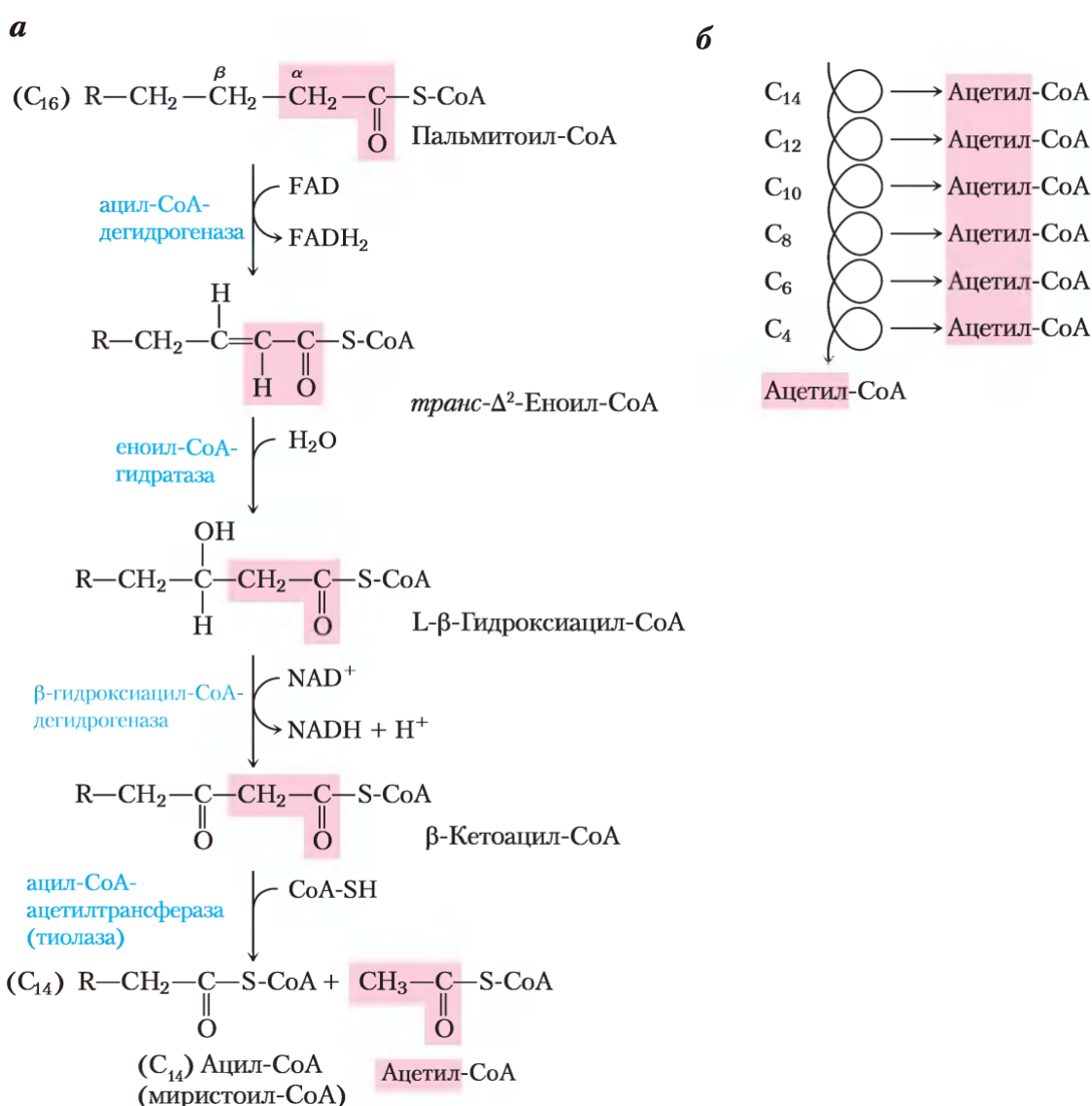


Рис. 8.4. Стадии β-окисления жирных кислот

Ацетил-СоА, образующийся при окислении жирных кислот, в дальнейшем окисляется до CO_2 и H_2O в цикле трикарбоновых кислот.

Каждая молекула FADH_2 , образующаяся при окислении жирной кислоты, отдаёт два электрона в дыхательную цепь, а при переносе каждой электронной пары на O_2 образуется примерно 1,5 молекулы АТФ. Точно так же каждая образующаяся молекула NADH отдаёт пару электронов митохондриальной NADH -дегидрогеназе, а в последующем переносе каждой пары электронов на O_2 образуется примерно 2,5 молекулы АТФ. Таким образом, в один оборот цикла при отщеплении двухуглеродного фрагмента образуется 4 молекулы АТФ.

Катаболизм жирных кислот с нечётным числом атомов углерода

Большинство природных липидов содержат жирные кислоты с нечётным числом атомов углерода.

Жирные кислоты с длинной углеродной цепью и нечётным числом атомов углерода окисляются тем же путём, что и кислоты с чётным числом, начиная с карбоксильного конца цепи. Однако субстратом для последнего прохождения через цикл β -окисления является ацил-СоА-производное жирной кислоты с пятью атомами углерода. Из этого вещества при окислении образуются ацетил-СоА и пропионил-СоА. Ацетил-СоА, конечно же, можно окислить в цикле трикарбоновых кислот, однако пропионил-СоА поступает в другой цикл, включающий три фермента.

Последовательность реакций включает карбоксилирование пропионил-СоА до D-метилмалонил-СоА и превращение последнего в сукцинил-СоА. Для этого превращения требуется эпимеризация D- в L-метилмалонил-СоА с последующей реакцией, в которой заместители при соседних атомах углерода меняются местами.

Рассмотрим подробнее данную последовательность реакций (рис. 8.5). Пропионил-СоА карбоксилируется с образованием D-стереоизомера метилмалонил-СоА под действием пропионил-СоА-карбоксилазы, содержащей кофактор биотин. Как и в реакции пируваткарбоксилазы, в этом ферментативном процессе CO_2 или ион гидрокарбоната HCO_3^- активируется, присоединяясь к биотину ещё до того, как попасть на субстрат (в данном случае пропионатный остаток). Для образования промежуточного соединения карбоксибиотина требуется энергия, которая поступает от распада АТФ до АДФ и P_i .

Образованный таким образом D-метилмалонил-СоА ферментативно эпимеризуется метилмалонил-СоА-эпимеразой в L-стереоизомер.

После этого L-метилмалонил-СоА подвергается внутримолекулярной перегруппировке с образованием сукцинил-СоА, который теперь может поступить в цикл трикарбоновых кислот. Эта перегруппировка катализируется метилмалонил-СоА-мутазой, которой в качестве кофермента требуется 5'-дезоксаденозилкобаламин, или кофермент B_{12} , получаемый из витамина B_{12} (кобаламина).

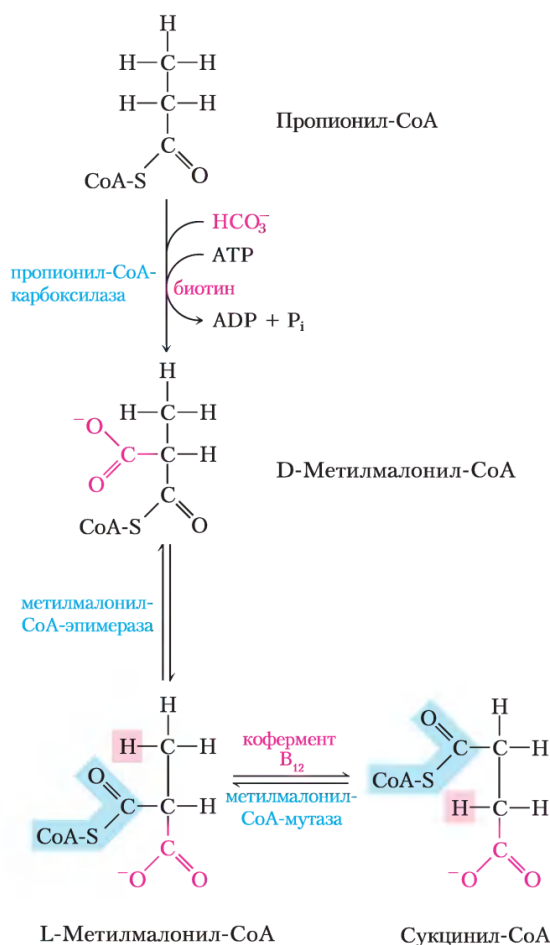


Рис. 8.5. Окисление пропионил-CoA

Витамин/кофермент B₁₂

В реакции метилмалонил-CoA-мутазы группа -CO-S-CoA в положении C-2 исходного пропионата обменивается на атом водорода в положении C-3 (рис. 8.6, а). Кофермент B₁₂ выступает кофактором, как и практически для всех ферментов, которые катализируют реакции главным образом этого типа (рис. 8.6, б). Такие кофермент B₁₂-зависимые процессы относятся к очень редким в биологии ферментативным реакциям, где происходит обмен между алкильной или замещенной алкильной группы (X) и атомом водорода при соседнем углероде, причём в этом обмене никогда не участвует водород растворителя H₂O.

Кофермент B₁₂ – это кофакторная форма витамина B₁₂. Среди всех других витаминов он уникален тем, что включает в свой состав не только сложную органическую молекулу, но и микроэлемент кобальт. Сложная корриновая кольцевая система витамина B₁₂ (на рис. 8.7 окрашена синим), в которой координирован кобальт (Co³⁺), родственна порфириновой кольцевой системе гема и гемсодержащих белков. В координационной сфере кобальта пятым лигандом является диметилбензимидазолрибонуклеотид (на рис. 8.7 выделен желтым), ковалентно

связанный своей 3'-фосфатной группой с боковой цепью корринового кольца через аминокпропанол.

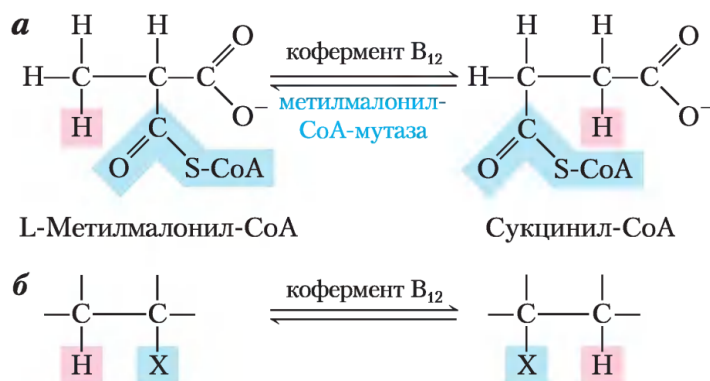


Рис. 8.6. Реакции с участием кофактора B_{12}

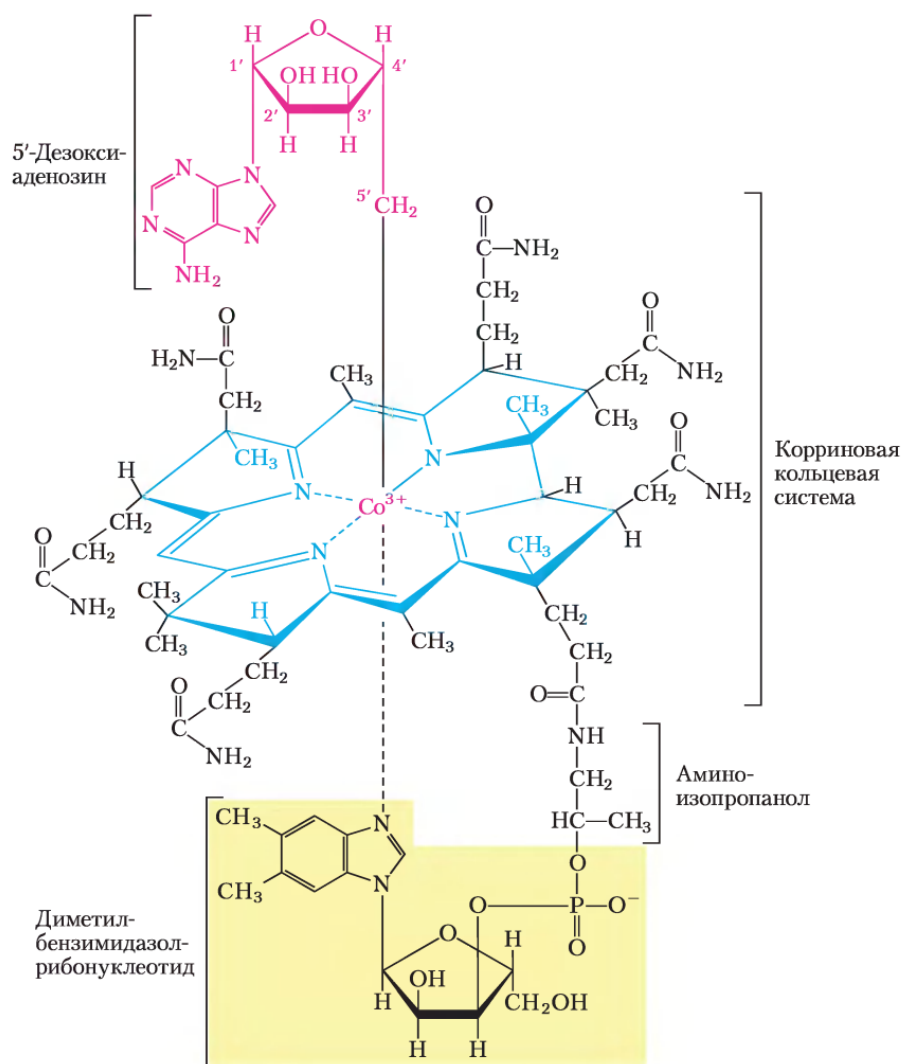


Рис. 8.7. Структура кофактора B_{12}

Образование такого сложного кофактора известно всего лишь для двух реакций, где от АТФ отщепляется трифосфат (рис. 8.8); другая реакция – образование S-аденозилметионина из АТФ и метионина.

Витамин В₁₂, как правило, называют цианокобаламином. Он содержит цианогруппу, которая присоединена к кобальту как шестой лиганд в координационной сфере. В 5'-дезоксаденозилкобаламине, кофакторе метилмалонил-СоА-мутаза, цианогруппа замещена на 5'-дезоксаденозильную группу (на рис. 8.7 окрашена красным), которая ковалентно связана с кобальтом через атом С-5'.

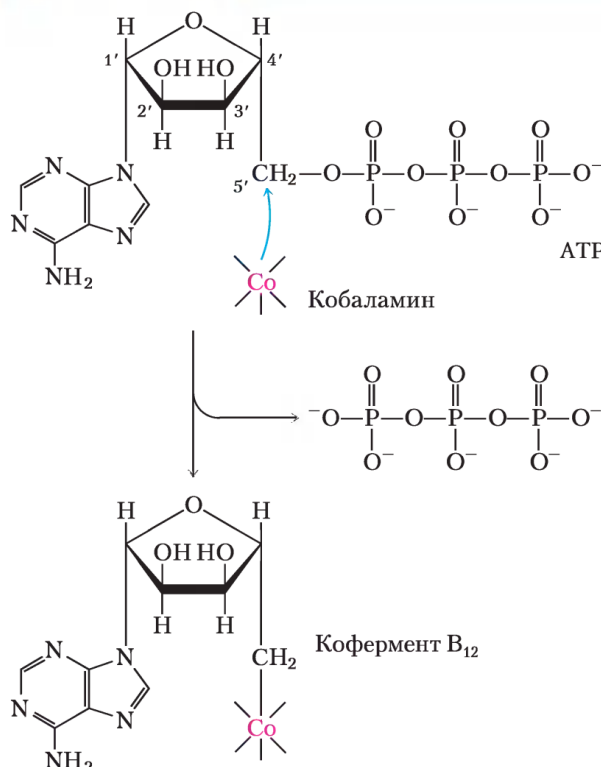


Рис. 8.8. Пример реакции с образованием кофактора В₁₂

Ключ к пониманию того, как кофермент В₁₂ катализирует обмен заместителями (алкил-водород), находится в свойствах ковалентной связи между кобальтом и атомом С-5' дезоксиаденозильной группы (рис. 8.7). Эта связь довольно слабая, чтобы её разорвать, достаточно просто подвергнуть соединение действию видимого света. При диссоциации получается 5'-дезоксаденозильный радикал и Со²⁺-форма витамина. Химическая функция 5'-дезоксаденозилкобаламина заключается в образовании свободных радикалов и инициации таким образом множества превращений, например, представленного на рис. 8.9 механизма реакции, катализируемой метилмалонил-СоА-мутазой, и ряда других кофермент В₁₂-зависимых превращений. В предложенном механизме мигрирующий атом водорода нигде не присутствует в свободном виде и поэтому никогда не способен вступить в обмен с водородом окружающих молекул воды.

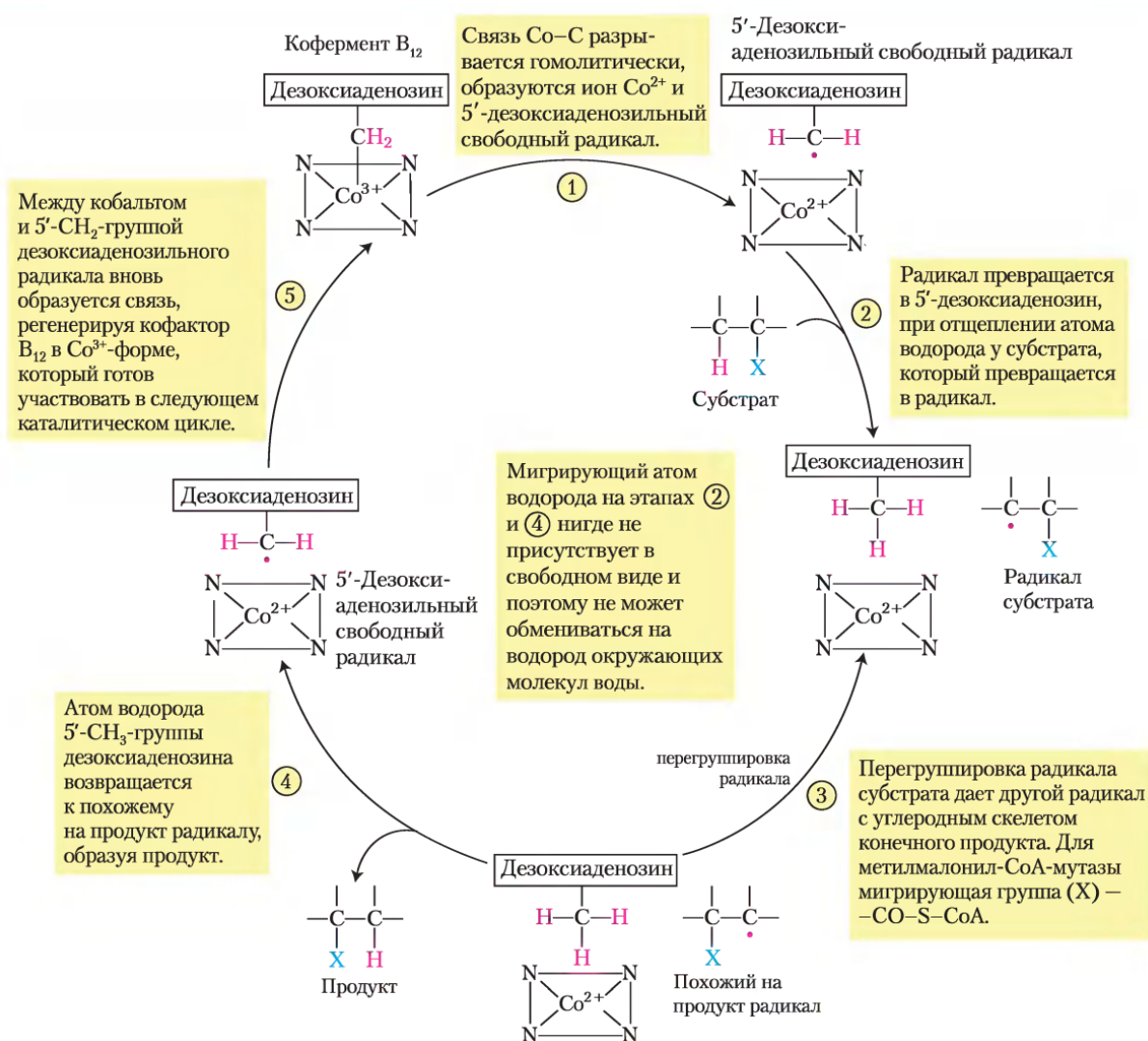


Рис. 8.9. Механизм реакции, катализируемой метилмалонил- CoA -мутазой

Недостаток витамина V_{12} приводит к серьезному заболеванию. Этот витамин не образуется ни у растений, ни у животных, он синтезируется всего несколькими видами микроорганизмов. Из-за неспособности эффективно всасывать витамин V_{12} из кишечника, где он синтезируется кишечной микрофлорой или образуется при переваривании мяса, возникает редкое заболевание – злокачественная анемия. У человека с этим заболеванием не образуется в достаточном количестве внутренний фактор – гликопротеин, необходимый для всасывания витамина V_{12} . При злокачественной анемии наблюдаются также симптомы прогрессирующего повреждения центральной нервной системы. В некоторых случаях введение больших доз витамина V_{12} смягчает эти симптомы.

Лекция 9. Катаболизм жирных кислот

β -Окисление в пероксисомах/глиоксисомах

Основным местом окисления жирных кислот в клетках животных служит митохондриальный матрикс, однако у некоторых клеток в других компартментах также содержатся ферменты, способные окислять жирные кислоты до ацетил-СоА по пути, который подобен, но не совсем идентичен митохондриальному. В клетках растений β -окисление в основном происходит не в митохондриях, а в пероксисомах.

В пероксисомах (заклѳченных в мембрану органеллах животных и растительных клеток) в роли промежуточных соединений β -окисления жирных кислот выступают производные кофермента А, а сам процесс состоит из четырёх стадий, как и в митохондриальном β -окислении (рис. 9.1):

- (1) дегидрирование
- (2) присоединение воды к образующейся двойной связи
- (3) окисление р-гидроксиацил-СоА до кетона
- (4) тиолитический разрыв кетона коферментом А

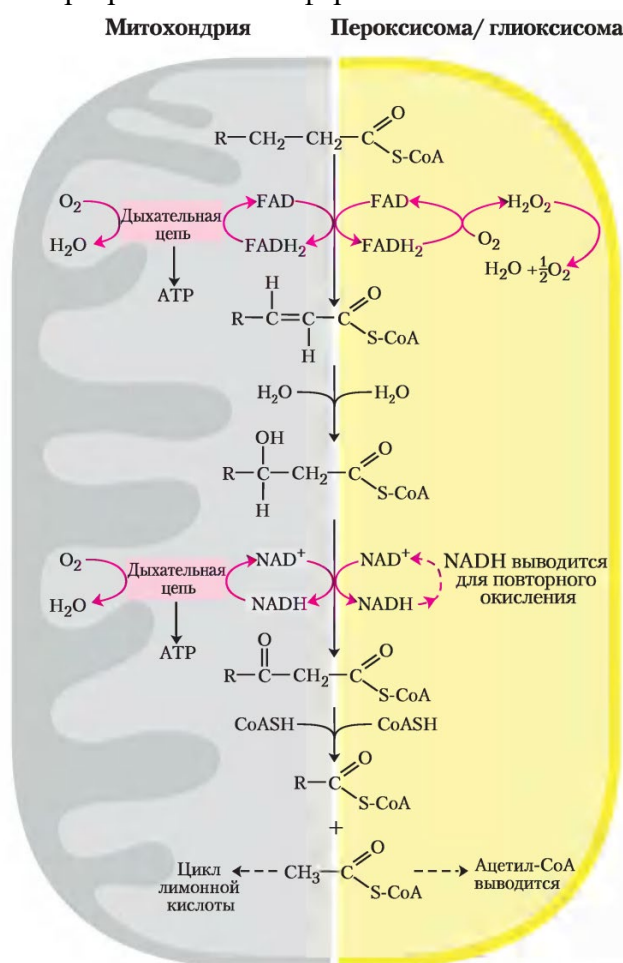


Рис. 9.1. Сравнение β -окисления в митохондриях и в пероксисомах/глиоксисомах.

Одно из различий между пероксисомальным и митохондриальным путями заключается в химии первого шага. В пероксисомах флавопротеин ацил-СоА-оксидаза, генерирующая двойную связь, передаёт электроны непосредственно на O_2 , образуя H_2O_2 (рис. 9.1). Этот сильный и потенциально разрушительный окислитель тут же распадается на H_2O и O_2 под действием каталазы. Вспомним, что в митохондриях электроны, взятые на первом шаге окисления, попадают на O_2 через дыхательную цепь, образуя H_2O , и этот процесс сопровождается синтезом АТФ. В пероксисомах же энергия, выделяющаяся на первом шаге окислительного распада жирных кислот, не сохраняется в виде АТФ, а выделяется в виде теплоты.

NADH, образованный на втором шаге окисления, не может быть вновь окислен в пероксисоме и глиоксисоме, поэтому восстановительные эквиваленты выводятся в цитозоль, вновь проникая со временем в митохондрии. Ацетил-СоА, образующийся в пероксисомах и глиоксисомах, тоже выводится. Ацетат из глиоксисом (органелл, обнаруженных только в прорастающих семенах) служит биосинтетическим предшественником. В то время как ацетил-СоА, образующийся в митохондриях, в дальнейшем окисляется в цикле трикарбоновых кислот. В этом состоит второе важное отличие β -окисления в митохондриях и пероксисомах.

У растений окисление жирных кислот происходит в основном не в митохондриях, а в пероксисомах тканей листа и в глиоксисомах прорастающих семян. Пероксисомы и глиоксисомы растений схожи по своей структуре и функциям. Глиоксисомы, встречающиеся только в прорастающих семенах, можно считать специализированными пероксисомами. Биологическая роль β -окисления в этих органеллах заключается в использовании запасённых липидов преимущественно для предоставления биосинтетических предшественников, а не энергии.

В период роста семян запасенные триацилглицерины превращаются в глюкозу, сахарозу и целый ряд важнейших метаболитов. Жирные кислоты, высвобождаемые из триацилглицеринов, вначале активируются, превращаясь в производные кофермента А, и окисляются в глиоксисомах в ходе точно такого же четырёхстадийного процесса, как и в пероксисомах. Образующийся ацетил-СоА превращается в глиоксилатном цикле в четырёхуглеродные предшественники для глюконеогенеза. Глиоксисомы, как и пероксисомы, содержат в высокой концентрации каталазу, которая превращает образующийся в процессе β -окисления H_2O_2 в H_2O и O_2 .

Окисление непредельных жирных кислот

У животных и растений в состав многих триацилглицеринов и фосфолипидов входят жирные кислоты с ненасыщенной углеводородной цепью, в которой имеется одна или несколько двойных связей. Этот углеводородный «хвост» может принимать *цис*-конфигурацию при кратной связи и из-за этого не подвержен действию фермента еноил-СоА-гидратазы, катализирующей присоединение молекулы H_2O по двойной связи только для *транс*-конфигурации Δ^2 -еноил-СоА, который образуется в процессе β -

окисления. Для β -окисления природных ненасыщенных жирных кислот требуются два дополнительных фермента: изомеразы и редуктазы. Проиллюстрируем эти вспомогательные реакции на двух примерах.

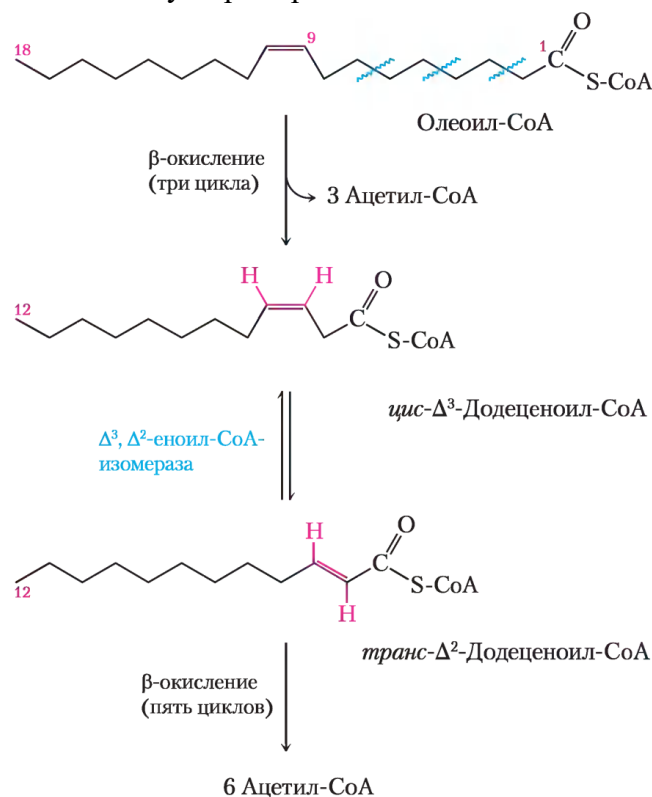


Рис. 9.2. Окисление мононенасыщенной жирной кислоты (олеоил-СoА (Δ^9))

Олеат – распространённая 18-углеродная мононенасыщенная жирная кислота с *цис*-конфигурацией при двойной связи между С-9 и С-10 (обозначается Δ^9). На первой стадии окисления олеат превращается в олеоил-СoА и, как и насыщенные жирные кислоты, с помощью карнитинового переносчика попадает в матрикс митохондрий (рис. 8.3). После этого олеоил-СoА три раза проходит через цикл окисления жирных кислот, образуя три молекулы ацетил-СoА, а также эфир кофермента А и 12-углеродной Δ^3 -ненасыщенной жирной кислоты – *цис*- Δ^3 -додеценоил-СoА (рис. 9.2). Этот продукт не может служить субстратом для еноил-СoА-гидратазы, которая действует только на *транс*-изомеры. Вспомогательный фермент Δ^3, Δ^2 -еноил-СoА-изомеразы делает из *цис*- Δ^3 -еноил-СoА изомерный *транс*- Δ^2 -еноил-СoА, который превращается еноил-СoА-гидратазой в соответствующий L- β -гидроксиацил-СoА (*транс*- Δ^2 -додеценоил-СoА). Теперь на этот промежуточный продукт действуют остальные ферменты β -окисления, образуя ацетил-СoА и сложный эфир кофермента А и 10-углеродной насыщенной жирной кислоты – деканоил-СoА. Последний ещё четыре раза проходит через цикл окисления, при этом получают дополнительные пять молекул ацетил-СoА. В итоге из одной молекулы 18-углеродного олеата образуется 9 молекул ацетил-СoА.

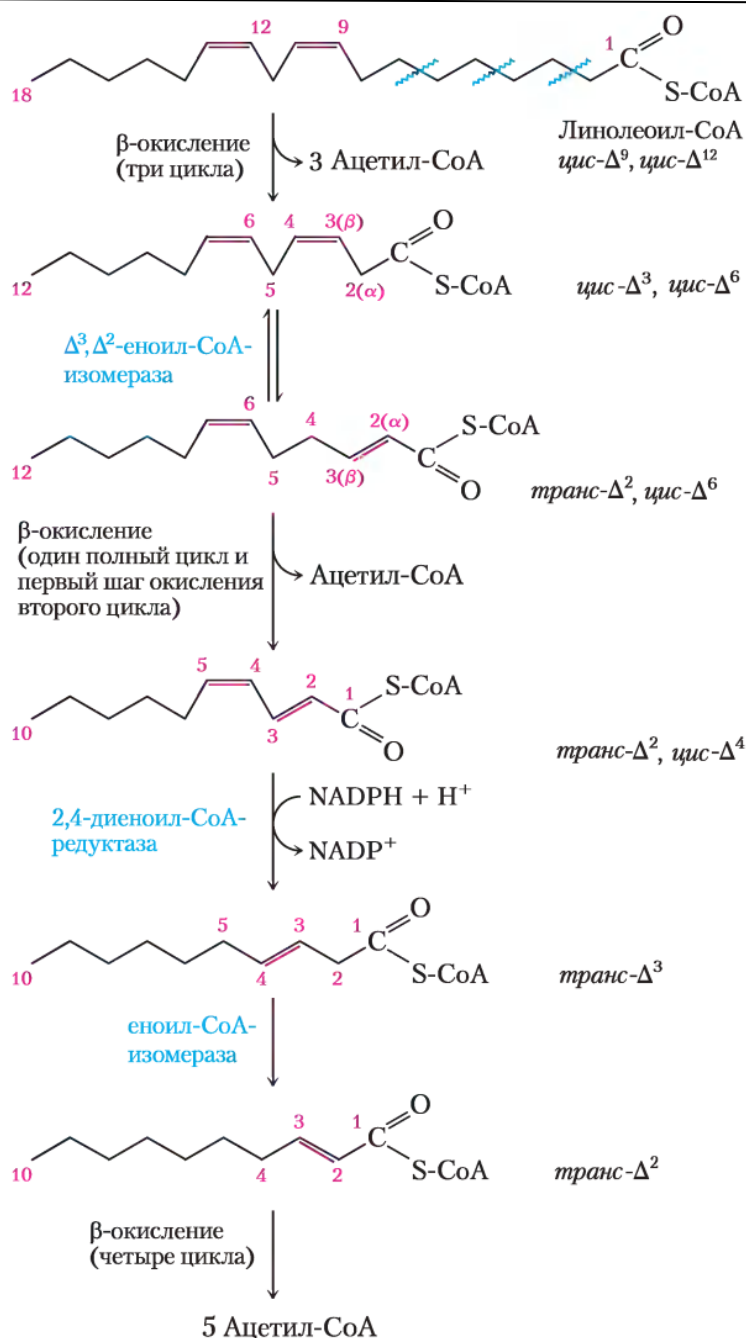


Рис. 9.3. Окисление полиненасыщенной жирной кислоты линолеоил-СоА ($\Delta^{9,12}$)

Для окисления полиненасыщенных жирных кислот, например, 18-углеродного линолеата $\text{cis-}\Delta^9, \text{cis-}\Delta^{12}$, нужен дополнительный фермент редуктаза (рис. 9.3). Линолеоил-СоА проходит три цикла β -окисления, образуя три молекулы ацетил-СоА и сложный эфир кофермента А и 12-углеродной ненасыщенной жирной кислоты с конфигурацией $\text{cis-}\Delta^3, \text{cis-}\Delta^6$. Этот интермедиат не подвергается действию ферментов β -окисления, поскольку у него не та конфигурация при двойных связях (cis- , а не trans-). Однако, как показано на рис. 9.3, совместное действие еноил-СоА-изомеразы и

2,4-диеноил-СoA-редуктазы даёт возможность этому интермедиату вновь попасть в цикл β-окисления и при расщеплении дать шесть молекул ацетил-СoA. Общим результатом является превращение линолеата в девять молекул ацетил-СoA.

α-Окисление жирных кислот с разветвлённой цепью

Фитановая кислота содержит β-углерод с метильным заместителем и поэтому не может подвергаться β-окислению. В связи с этим катаболизм таких разветвлённых жирных кислот происходит в пероксисомах клеток животных путём α-окисления.

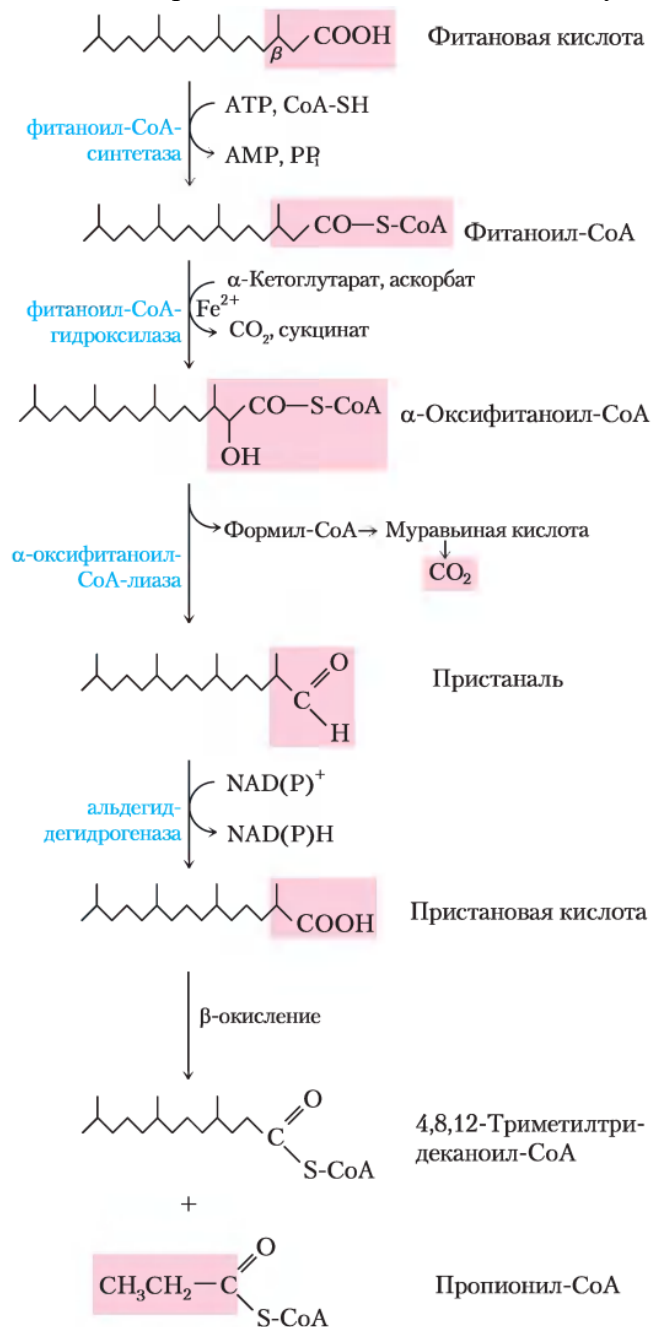


Рис. 9.4. α-Окисление фитановой кислоты в пероксисомах

При окислении, например, фитановой кислоты (рис. 9.4) фитаноил-СоА гидроксيليруется по α -углероду в реакции, включающей молекулярный кислород; декарбоксилируется с образованием альдегида, который на один атом углерода короче; а затем окисляется до соответствующей карбоновой кислоты, у которой теперь уже нет заместителя на β -углероде и которую в дальнейшем можно запустить в процесс β -окисления. Важно, что при β -окислении пристановой кислоты образуется пропионил-СоА, а не ацетил-СоА. Дальнейший его катаболизм происходит в соответствии с рис. 8.5. Детали реакции с образованием пристанала остаются спорными.

Болезнь Рефсума, возникающая из-за генетического дефекта в фитаноил-СоА-гидроксилазе, приводит к очень высокому содержанию фитановой кислоты в крови и серьёзным неврологическим проблемам, включая слепоту и глухоту.

ω -Окисление жирных кислот в ЭПР

Митохондриальное β -окисление, в котором ферменты действуют на карбоксильном конце жирной кислоты, является важнейшим путём катаболизма жирных кислот в клетках животных. Однако у некоторых видов, включая позвоночных, есть другой путь, приводящий к окислению ω (омега)-углерода – атома углерода, который наиболее удалён от карбоксильной группы. Ферменты ω -окисления находятся (у позвоночных) в эндоплазматическом ретикулуме печени и почек, а в качестве субстратов предпочтение отдаётся жирным кислотам с 10-12 атомами углерода. У млекопитающих ω -окисление – это обычно второстепенный путь распада жирных кислот, однако в случае нарушения β -окисления (например, из-за мутации или из-за нехватки карнитина) оно приобретает намного большее значение.

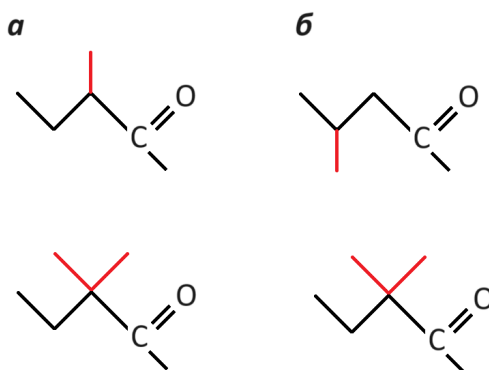


Рис. 9.5. Заместители, блокирующие а – α -путь; б – β -путь

На первой стадии гидроксильная группа присоединяется к ω -углероду (рис. 9.5). Кислород для этой группы приходит от молекулярного кислорода в результате сложной реакции, включающей цитохром P450 и донор электронов NADPH. Реакции такого типа катализируют **многофункциональные оксидазы**.

После этого на ω -углерод действуют ещё два фермента: алкогольдегидрогеназа окисляет гидроксильную группу до альдегида, а альдегиддегидрогеназа окисляет альдегидную группу до карбоновой кислоты, образуя жирную кислоту с

карбоксильными группами на каждом конце. На этом этапе любой из концов можно присоединить к коферменту А так, чтобы молекула смогла попасть в митохондрию и подвергнуться β-окислению привычным способом. При каждом прохождении по маршруту β-окисления жирные кислоты с «двойными концами» образуют дикарбоновые кислоты, например, янтарную кислоту, которая поступает в цикл трикарбоновых кислот, и адипиновую кислоту (рис. 9.6).

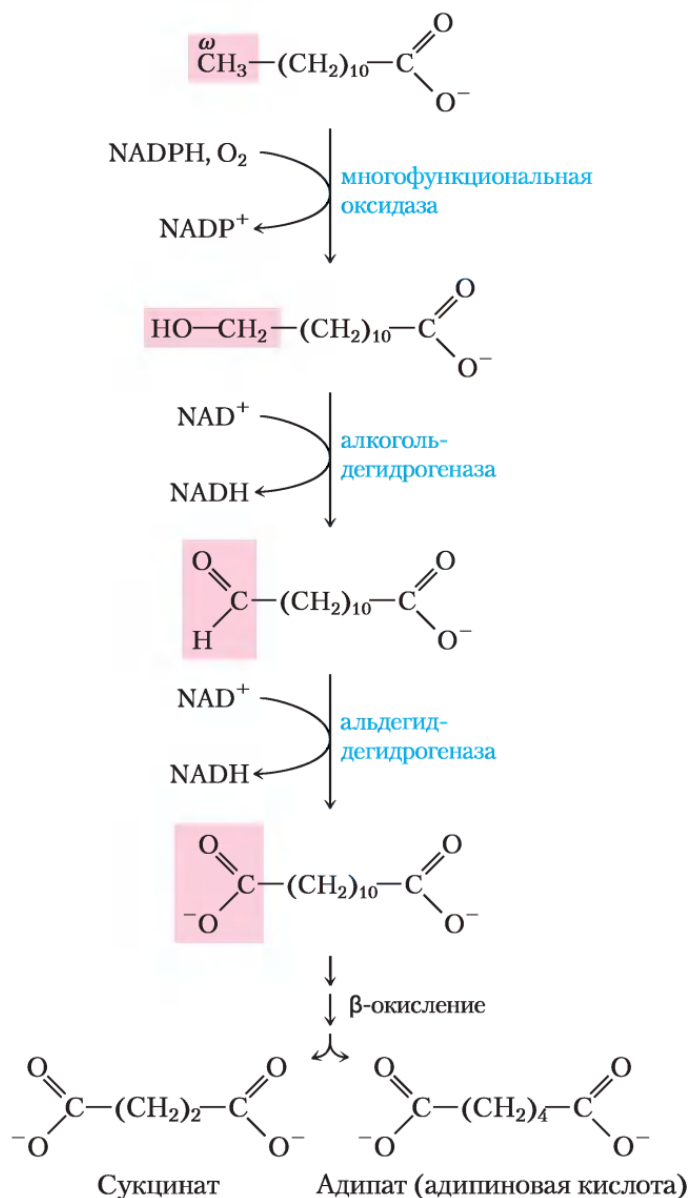


Рис. 9.6. ω-Окисление жирных кислот в эндоплазматическом ретикулуме

Лекция 10. Кетоновые тела. Биосинтез жирных кислот

Кетоновые тела

У людей и большинства других млекопитающих ацетил-СоА, образующийся в печени в процессе окисления жирных кислот, может либо поступить в цикл трикарбоновых кислот, либо превратиться в «кетоновые тела», ацетон, ацетоацетат и D-β-гидроксибутират для экспорта в другие ткани. Термин «тела» является историческим. Изредка его используют в отношении нерастворимых частиц, однако данные соединения полностью растворимы в крови и моче.

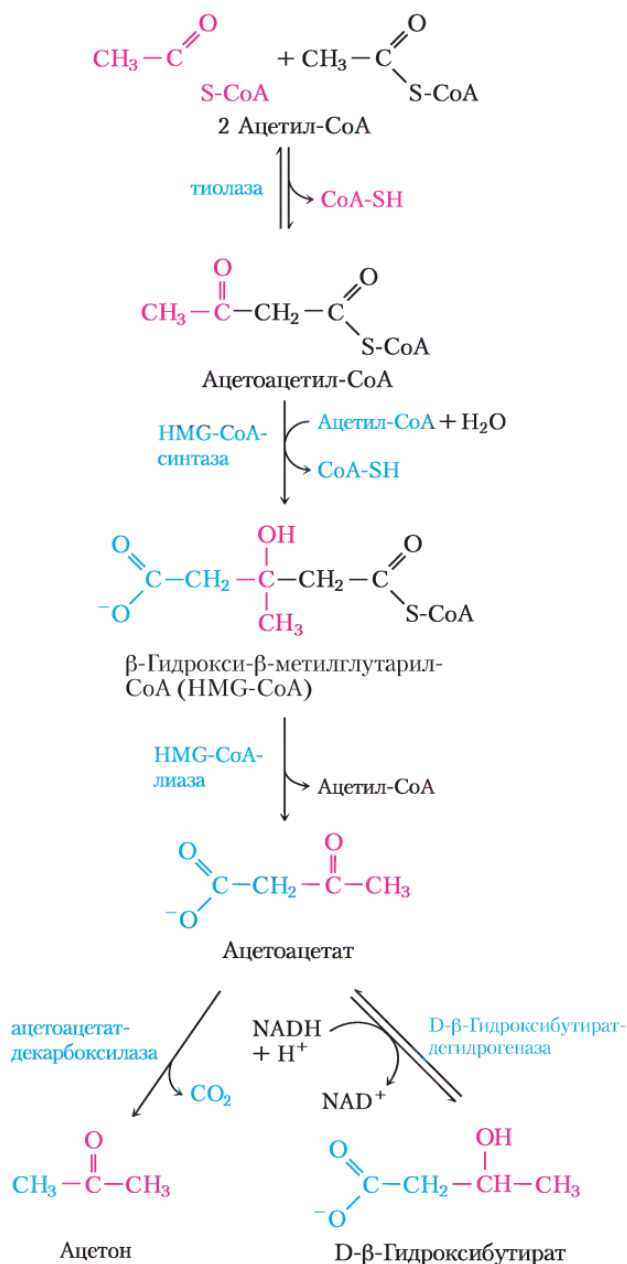


Рис. 10.1 Образование кетоновых тел из ацетил-СоА

Ацетон, образующийся в меньших количествах, чем остальные кетоновые тела, испаряется. Ацетоацетат и D-β-гидроксibuтират переносятся кровью к тканям. Везде, кроме печени, они превращаются в ацетил-СоА и окисляются в цикле трикарбоновых кислот. Кетоновые тела дают энергию таким тканям, как скелетные и сердечная мышцы, корковое вещество почек. Мозг, который в качестве источника энергии использует преимущественно глюкозу, в условиях голодания может приспособиться к употреблению ацетоацетата или D-β-гидроксibuтирата. Образование и экспорт кетоновых тел из печени во внепечёночные ткани позволяет жирным кислотам непрерывно окисляться в печени, если ацетил-СоА не окисляется в цикле трикарбоновых кислот.

Первая стадия образования ацетоацетата происходит в печени (рис. 10.1) и заключается в ферментативной конденсации двух молекул ацетил-СоА, которую катализирует тиолаза. Это просто обратная реакция последней стадии β-окисления. Затем образовавшийся ацетоацетил-СоА конденсируется с ацетил-СоА, образуя β-гидрокси-β-метилглутарил-СоА (HMG-СоА), который распадается на свободный ацетоацетат и ацетил-СоА. Ацетоацетат обратимо восстанавливается митохондриальным ферментом D-β-гидроксibuтиратдегидрогеназой до D-β-гидроксibuтирата. Этот фермент специфичен к D-стереоизомеру. Он не действует на L-β-гидроксиацил-СоА, и его не надо путать с L-β-гидроксиацил-СоА-дегидрогеназой β-окислительного пути.

У здорового человека из ацетоацетата в очень малых количествах образуется ацетон, который легко декарбоксилируется – либо спонтанно, либо под действием ацетоацетатдекарбоксилазы (рис. 10.1). Поскольку при нелеченом диабете образуется много ацетоацетата, в крови наблюдается высокое содержание токсичного ацетона. Ацетон летуч и придаёт дыханию характерный запах, что иногда помогает при диагностике диабета.

Во внепечёночных тканях D-β-гидрокси-бутиратдегидрогеназа окисляет D-β-гидроксibuтират до ацетоацетата (рис. 10.2). Ацетоацетат активируется в реакции, катализируемой β-кетоацил-СоА-трансферазой. При переносе СоА с сукцинил-СоА (промежуточного соединения цикла трикарбоновых кислот) образуется сложный эфир кофермента А. Затем ацетоацетил-СоА распадается под действием тиолазы на две молекулы ацетил-СоА, которые поступают в цикл трикарбоновых кислот. Таким образом, кетоновые тела используются в качестве источника энергии во всех тканях, за исключением печени, в которой отсутствует тиолаза. Поэтому печень производит кетоновые тела для других тканей, но сама их не использует.

Образование и экспорт кетоновых тел печени позволяет жирным кислотам непрерывно окисляться с минимальным окислением ацетил-СоА. Например, если промежуточные соединения цикла трикарбоновых кислот перекачиваются для синтеза глюкозы в процессе глюконеогенеза, окисление интермедиатов цикла (следовательно, и окисление ацетил-СоА) притормаживается. Более того, печень содержит всего лишь

ограниченные количества кофермента А, и если бóльшая часть его связана в ацетил-СоА, β-окисление замедляется из-за нехватки свободного кофермента. Образование и экспорт кетонových тел высвобождает кофермент А, делая окисление жирных кислот непрерывным.

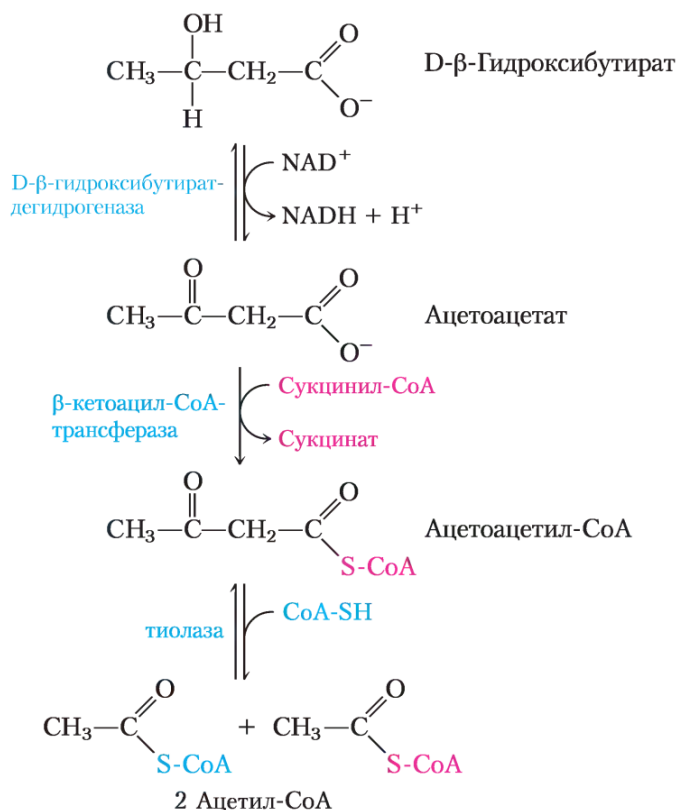


Рис. 10.2. D-β-Гидроксibuтират в качестве источника энергии

Биосинтез жирных кислот

После открытия, что окисление жирных кислот происходит путём последовательного окислительного отщепления двухуглеродных (ацетил-СоА) фрагментов (рис. 8.4), биохимики предположили, что биосинтез жирных кислот, вероятно, происходит просто в обратных реакциях тех же самых ферментативных стадий. Однако, как удалось обнаружить, биосинтез и распад жирных кислот протекают по различным путям, катализируются разными наборами ферментов и идут в разных частях клетки. Более того, биосинтез требует участия трёхуглеродного промежуточного соединения малонил-СоА, который не задействован в распаде жирных кислот.

Образование малонил-СоА из ацетил-СоА – необратимый процесс, который катализируется ацетил-СоА-карбоксилазой. Бактериальный фермент имеет три функциональные области (рис. 10.3): биотин-переносящий белок (серый), биотинкарбоксилаза (активирует CO₂, присоединяя его к азоту в биотиновом кольце

путём АТР-зависимой реакции) и транскарбоксилаза (переносит активированный CO_2 (выделен зеленым) с биотина на ацетил-СоА, образуя малонил-СоА). Длинная подвижная биотиновая «рука» переносит активированный CO_2 от биотинкарбоксилазы на активный центр транскарбоксилазы. Активный фермент в каждой стадии выделен голубым.

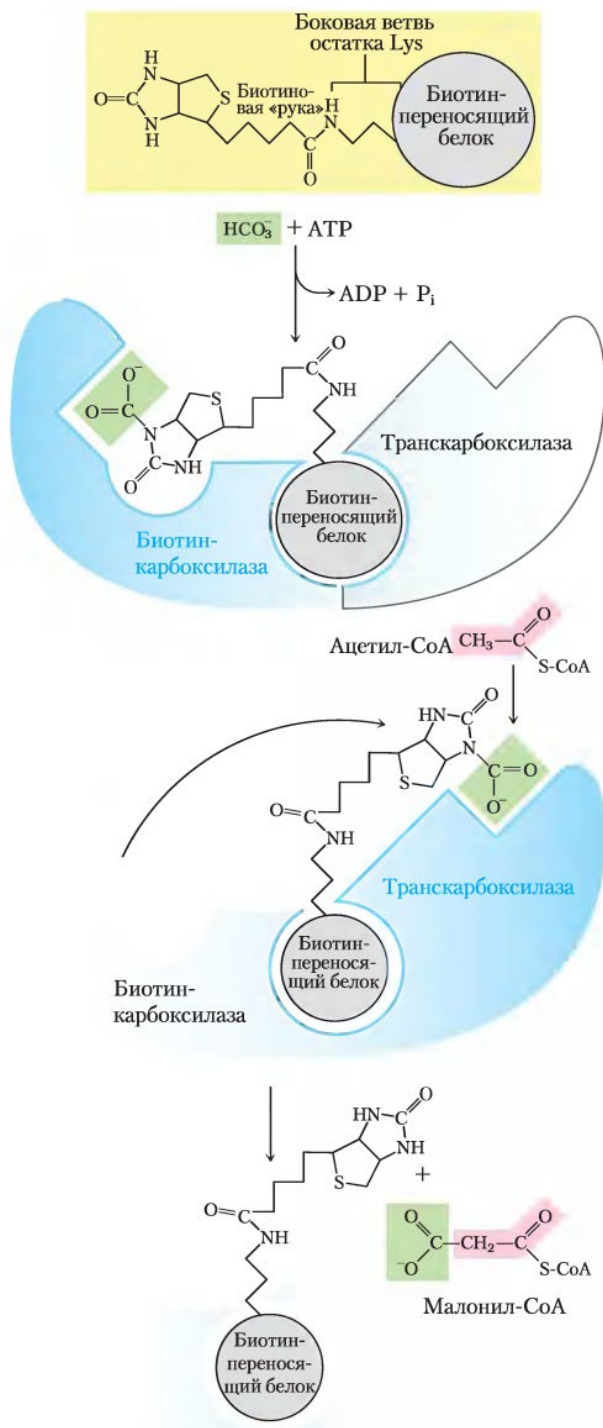


Рис. 10.3 Реакция ацетил-СоА-карбоксилазы

В животных клетках ферментативную активность обеспечивает один полифункциональный полипептид. Растительные клетки содержат оба типа ацетил-СоА-карбоксилазы. Фермент с биотином как простетической группой всегда ковалентно связан амидной связью с ε-аминогруппой остатка Lys одной из трёх полипептидных субъединиц или одного из доменов полифункционального фермента.

Карбоксильная группа, получающаяся из гидрокарбоната (HCO_3^-), первой переносится на биотин в АТР-зависимой реакции. Биотинильная группа служит временным переносчиком CO_2 , во второй стадии передавая его на ацетил-СоА с образованием малонил-СоА.

Синтаза жирных кислот

У всех организмов длинные углеродные цепи жирных кислот собираются в ходе четырёхстадийной последовательности реакций, которая катализируется ферментативной системой, называемой синтазой жирных кислот (СЖК, рис. 10.4). Это молекулярный конвейер, который представляет собой мультидоменный большой белок (у животных) или комплекс из отдельных субъединиц (у прокариот). Насыщенная ацильная группа, получающаяся в этих реакциях, становится субстратом для последующей конденсации с активированной малонильной группой. При каждом обороте цикла длина жирнокислотной цепи увеличивается на два углерода.

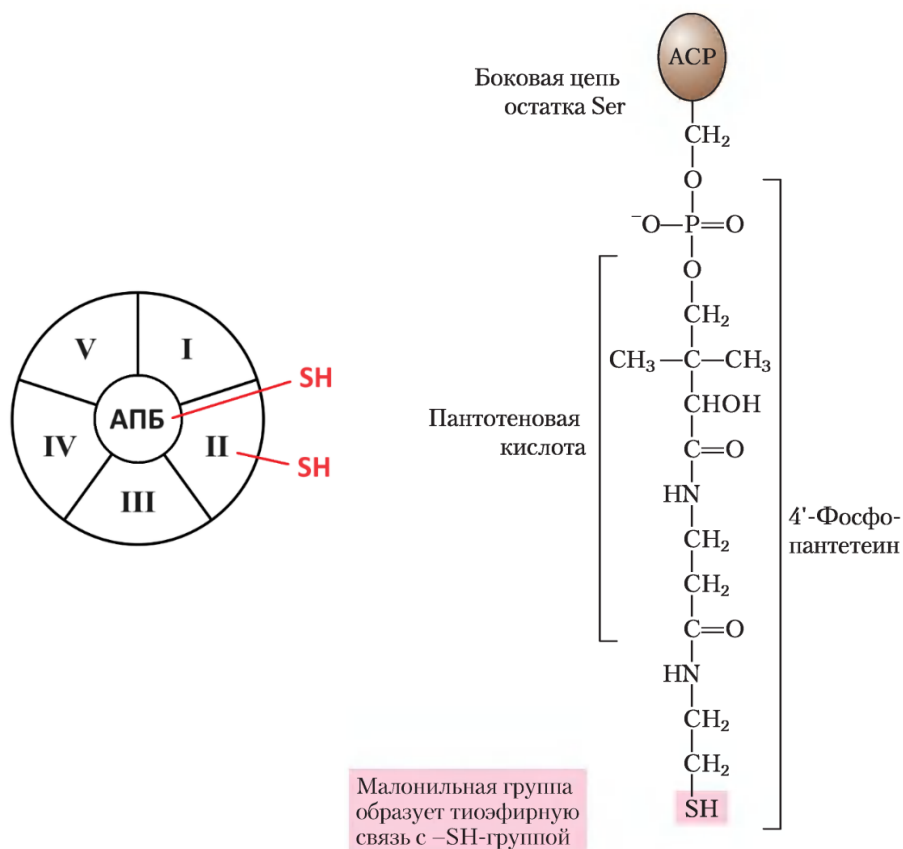


Рис. 10.4. Схема строения синтазы жирных кислот (слева) и АПБ (справа)

Ферменты:

- I – малонил/ацил-АПБ-трансфераза (МАТ)
- II – β-кетоацил-АПБ-синтаза (KS)
- III – β-кетоацил-АПБ-редуктаза (KR)
- IV – 3-D-гидроксиацил-АПБ-дегидратаза (DH)
- V – Δ²-трансеноил-АПБ-редуктаза (ER)

Ацилпереносящий белок (АПБ) – это молекулярный кронштейн, связывающий между собой отдельные участки ферментного комплекса (рис. 10.4). Это небольшой белок с молекулярной массой порядка 7,5 кДа, содержащий простетическую группу 4'-фосфоантатеин (похоже на кофермент А, но вместо части ADP содержится остаток серина, с которым далее всё связано ковалентно). Считается, что 4'-фосфоантатеиновая простетическая группа служит гибким манипулятором, присоединяющим растущую жирноацильную цепь к поверхности комплекса синтазы жирных кислот при переносе промежуточных продуктов реакции от активного центра одного фермента к следующему.

На рис. 10.5 суммированы основные различия катаболизма и анаболизма жирных кислот.

критерий	катаболизм	анаболизм
фрагмент	C ₂	C ₂ (C ₃)
переносчик	CoA	АПБ
локализация	матрикс митохондрий	цитозоль
коферменты/кофакторы	FAD, NAD ⁺	NADPH
ОН-производное	L-	D-

Рис. 10.5. Сравнение катаболизма и анаболизма жирных кислот

Механизм биосинтеза жирных кислот

Прежде чем могут начаться реакции конденсации, которые достраивают жирнокислотную цепь, на двух тиольных группах в ферментном комплексе должны быть созданы заряды с помощью ионизованных ацильных групп (рис. 10.6, вверху). В первую очередь в реакции, катализируемой малонил/ацетил-СоА-АПБ-трансферазой (этот фермент обозначен как МАТ на рис. 10.6 и образует отдельный домен полифункционального полипептида), ацетильная группа ацетил-СоА переносится на АПБ. Затем ацетильная группа переносится на -SH-группу цистеина β-кетоацил-АПБ-синтазы (KS). Вторая реакция – перенос малонильной группы от малонил-СоА на -SH-группу АПБ – также катализируется малонил/ацетил-СоА-АПБ-трансферазой.

В ионизованном синтазном комплексе ацетильная и малонильная группы находятся очень близко друг к другу и, чтобы произошло удлинение цепи, они должны быть просто активированы.

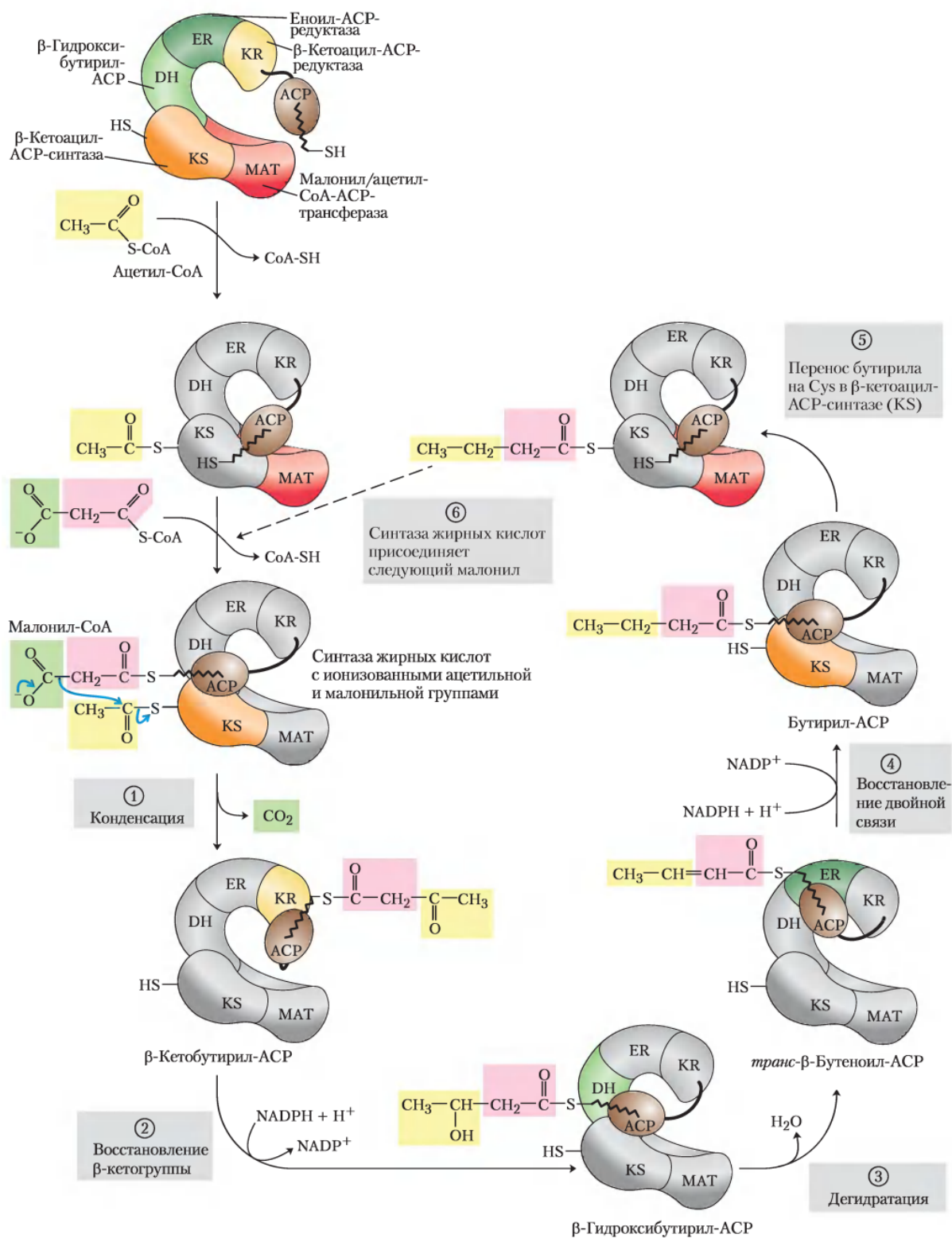


Рис. 10.6 Последовательность реакций при синтезе жирных кислот

Стадия ① – конденсация

При образовании жирнокислотной цепи первой реакцией формально является конденсация Кляйзена с участием активированных ацетильной и малонильной групп, в результате чего получается ацетоацетил-АПБ, где ацетоацетильная группа связана с АПБ через -SH-группу фосфопантатеина. Одновременно высвобождается молекула CO_2 . В этой реакции, катализируемой β -кетоацил-АПБ-синтазой (KS), ацетил переносится от -SH-группы на цистеине в молекуле фермента к малонилу на -SH в АПБ и становится двухуглеродной единицей новой ацетоацетильной группы с метилом на конце.

Углеродный атом CO_2 , образующегося в этой реакции – это тот самый атом углерода, который был первоначально введён в малонил-СоА из HCO_3^- путём карбоксилазной реакции (рис. 10.3). Таким образом, при биосинтезе жирных кислот CO_2 связан ковалентно и только на время. Он удаляется по мере добавления каждой двухуглеродной единицы.

Используя активированные малонины в синтезе жирных кислот и активированный ацетат в их деградации, клетка делает оба процесса энергетически благоприятными, хотя по результату они противоположны. Дополнительную энергию, необходимую для того, чтобы сделать синтез жирных кислот энергетически выгодным, предоставляет АТФ, который участвует в синтезе малонил-СоА из ацетил-СоА и HCO_3^- (рис. 10.3).

Стадия ② – восстановление карбонильной группы

Карбонильная группа на С3 ацетоацетила-АПБ, образованного на стадии конденсации, восстанавливается до D- β -гидроксibuтирил-АПБ. Эта реакция катализируется β -кетоацил-АПБ-редуктазой (KR), а донором электронов служит NADPH. Заметим, что геометрия D- β -гидроксibuтирильной группы не такая, как у L- β -гидроксиацильного интермедиата при окислении жирных кислот (см. рис. 8.4).

Стадия ③ – дегидратация

От С2 и С3 в D- β -гидроксibuтирил-АПБ удаляется молекула воды с образованием двойной связи в продукте реакции транс- Δ^2 -бутеноил-АПБ. Эту дегидратацию катализирует фермент β -гидроксиацил-АПБ-дегидратаза (HD).

Стадия ④ – восстановление двойной связи

Наконец, двойная связь транс- Δ^2 -бутеноил-АПБ восстанавливается. Под действием еноил-АПБ-редуктазы (ER) образуется бутирил-АПБ, причём донором электрона вновь служит NADPH.

Образование АПБ, содержащего насыщенный жирный ацил, завершает один проход через комплекс синтазы жирных кислот. Бутирил переносится теперь от -SH фосфопантатеина в АПБ на -SH-группу цистеина в β -кетоацил-АПБ-синтазе, которая первоначально несла ацетил (рис. 10.6). Чтобы начать следующий цикл из четырёх реакций, удлиняющий цепь ещё на два атома углерода, к незанятой в этот момент -SH-

группе фосфоантатеина в АПБ присоединяется следующий малонил (рис. 10.7). Происходит конденсация – бутирил, как ацетил в первом цикле, присоединяет два атома углерода от малонил-АПБ с одновременным высвобождением CO₂. Продуктом этой конденсации является шестиуглеродный ацил, который ковалентно связан с -SH-группой фосфоантатеина. В следующих трёх реакциях синтазного цикла β-кетогруппа восстанавливается и, как и в первой стадии, образуется шестиуглеродный продукт.

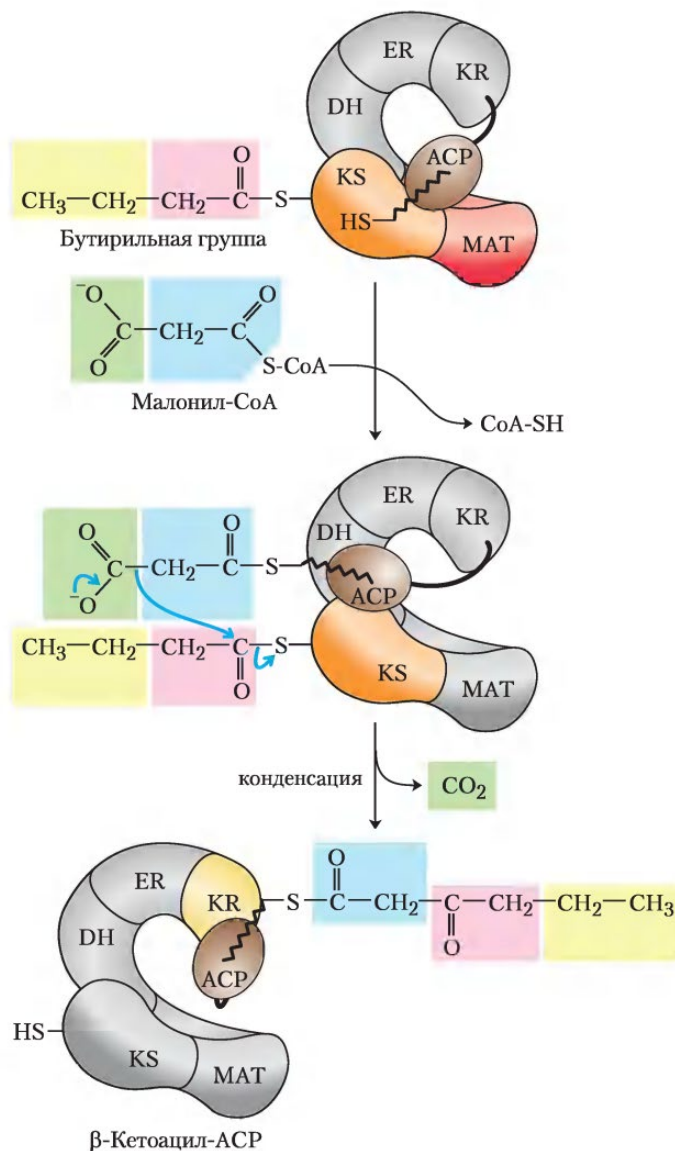


Рис. 10.7. Начало второй стадии цикла синтеза жирных кислот

Семь циклов конденсации-восстановления производят 16-углеродную насыщенную пальмитоильную группу, пока ещё связанную с АПБ. Элонгация цепи синтазным комплексом в этот момент прекращается, и свободный пальмитат под действием гидролитического компонента комплекса (тиоэстеразы; ТЕ) отщепляется от АПБ.

Можно считать, что полная реакция синтеза пальмитата из ацетил-СоА состоит из двух стадий. Первая стадия – это образование семи молекул малонил-СоА. Затем происходят семь циклов конденсации-восстановления. В итоге образуется шесть молекул воды, поскольку одна молекула расходуется для гидролиза тиоэфирной связи между пальмитатом (продуктом реакции) и ферментом.

Таким образом, биосинтез жирных кислот, таких как пальмитат, нуждается в ацетил-СоА и в поступлении химической энергии в двух формах: энергии переноса группы АТР и восстановительного потенциала NADPH. Для присоединения CO₂ к ацетил-СоА с образованием малонил-СоА необходим АТР; NADPH требуется для восстановления двойных связей.

Синтез жирных кислот происходит в компартменте, где NADPH доступен для восстановительного синтеза (т.е. где отношение [NADPH/NADP⁺] высокое).

Клетки дрожжей и позвоночных отличаются от клеток высших растений по компартиментализации липидного метаболизма. У большинства высших эукариот комплекс синтазы жирных кислот находится исключительно в цитозоле (рис. 10.8), как и ферменты биосинтеза нуклеотидов, аминокислот и глюкозы. Такая локализация обеспечивает изоляцию реакций биосинтеза от катаболических реакций, многие из которых протекают в митохондриальном матриксе.

В фотосинтезирующих клетках растений синтез жирных кислот происходит не в цитозоле, а в строме хлоропласта (рис. 10.8). Это объясняется тем, что NADPH образуется в хлоропластах в ходе световых реакций фотосинтеза.

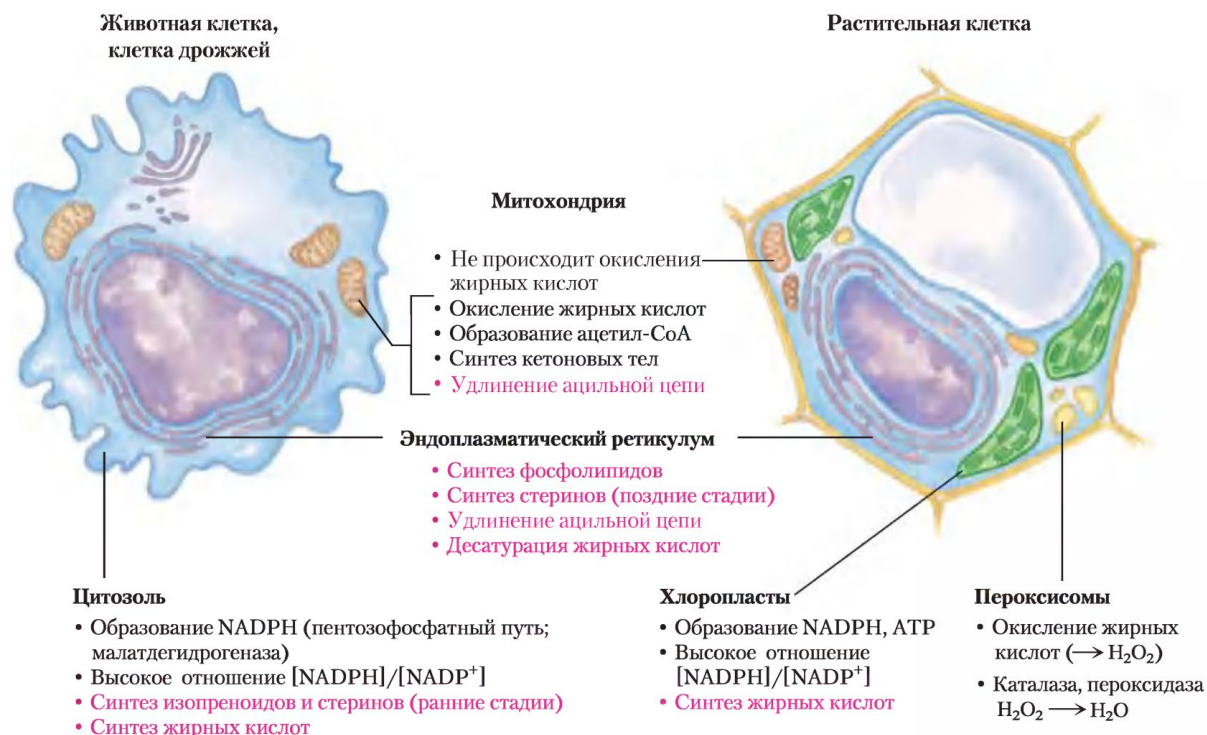


Рис. 10.8. Внутриклеточная локализация метаболизма липидов

Лекция 11. Регуляция синтеза жк. Синтез ацилглицеридов

Челночная система для переноса ацетил-СоА

У нефотосинтезирующих эукариот почти весь ацетил-СоА, используемый в синтезе жирных кислот, образуется в митохондриях в результате окисления пирувата и катаболизма углеродных остовов аминокислот. Ацетил-СоА, образующийся при окислении жирных кислот, не вносит существенного вклада в биосинтез жирных кислот у животных, поскольку два этих пути взаиморегулируются, как описано ниже.

Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для ацетил-СоА, поэтому ацетильные эквиваленты переносит через внутреннюю мембрану дополнительный челнок (рис. 11.1). Внутримитохондриальный ацетил-СоА сначала реагирует с оксалоацетатом в цикле лимонной кислоты, образуя цитрат по реакции, катализируемой цитратсинтазой (рис. 3.11).

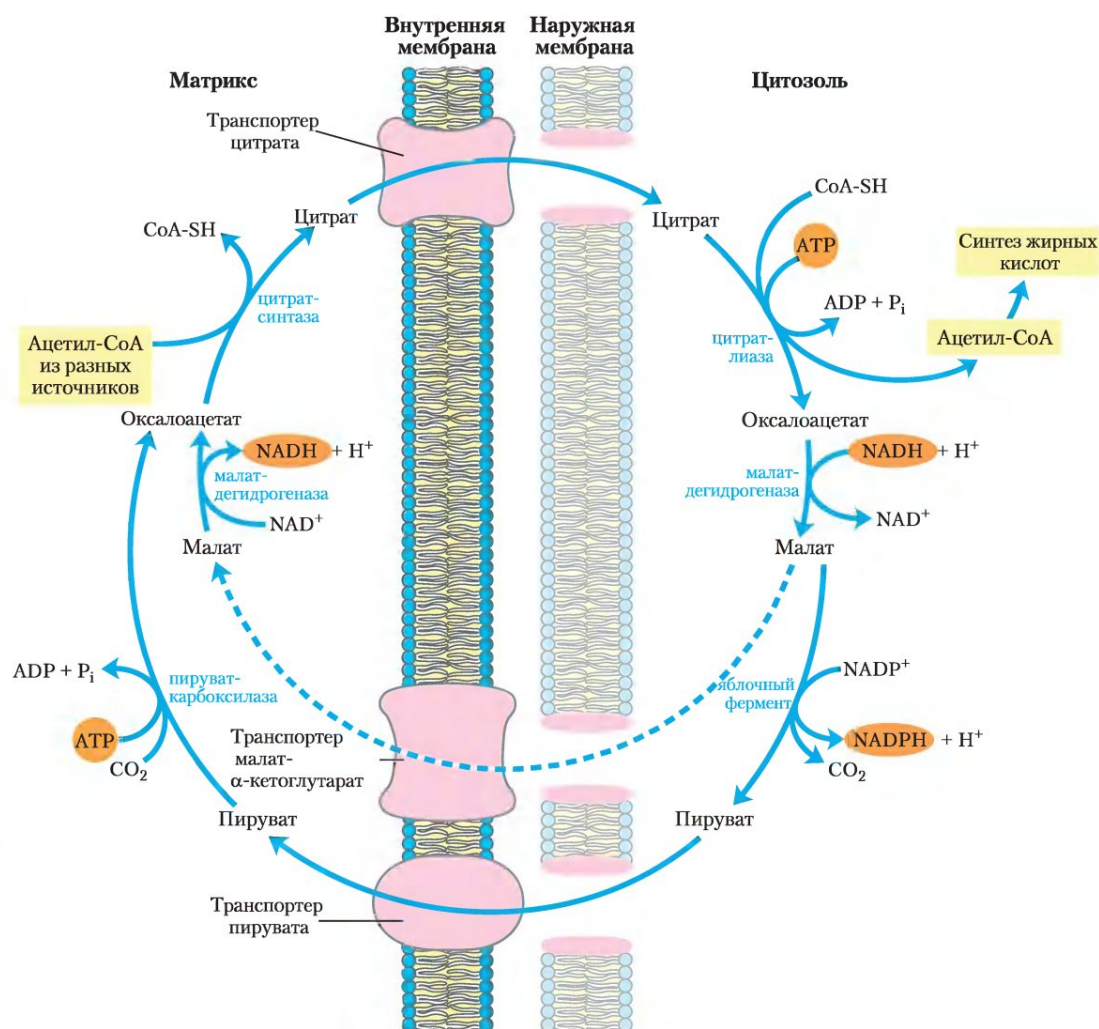


Рис. 11.1. Челнок для переноса ацетильных групп из митохондрий в цитозоль

Когда организму не нужна энергия, в матриксе митохондрий накапливается избыток цитрата, который проходит внутреннюю мембрану с помощью цитратного транспортёра, внешнюю через порины и попадает в цитозоль. В цитозоле при расщеплении цитрата цитратлиазой в результате АТР-зависимой реакции регенерируется ацетил-СоА. То есть ацетильные группы выходят из митохондрии в виде цитрата. Большая часть получившегося ацетил-СоА будет карбоксилирована, образуется малонил-СоА, который далее вовлекается в синтез жирных кислот. Цитрат является одновременно и поставщиком ацетильных групп для строительства жирных кислот, и мощным активатором ацетил-СоА-карбоксилазы.

Оксалоацетат не может вернуться непосредственно в митохондриальный матрикс, поскольку для него нет переносчика. Вместо этого цитозольная малатдегидрогеназа восстанавливает оксалоацетат до малата, который возвращается в митохондриальный матрикс с помощью малат- α -кетоглутаратного транспортёра в обмен на цитрат. В матриксе малат повторно окисляется до оксалоацетата, завершая челночный цикл.

Однако основные количества малата, образующегося в цитозоле, используются для производства цитозольного NADPH с помощью яблочного фермента (анаплеротическая реакция №4). Образующийся пируват переносится в митохондрии специализированным переносчиком (рис. 11.1) и в матриксе превращается обратно в оксалоацетат при участии пируваткарбоксилазы (анаплеротическая реакция №1).

На этот цикл расходуется две молекулы АТР (одна нужна в цитратлиазной реакции, другая – в пируваткарбоксилазной) на молекулу ацетил-СоА. После отщепления цитрата с образованием ацетил-СоА происходит превращение четырёх оставшихся атомов углерода в молекулы пирувата и CO_2 при участии яблочного фермента, что сопровождается образованием приблизительно половины того количества NADPH, которое необходимо для синтеза жирных кислот. Остальной NADPH поступает из пентозофосфатного пути.

Регуляция биосинтеза жирных кислот

Когда у клетки или организма метаболической энергии больше, чем нужно для удовлетворения её энергетических потребностей, избыток цитрата обычно конвертируется в жирные кислоты и сохраняется в виде липидов (триацилглицеринов). То есть начинается активный анаболизм. Реакция, катализируемая ацетил-СоА-карбоксилазой, является лимитирующей скоростью стадией в биосинтезе жирных кислот, и этот фермент играет важную роль в регуляции. У позвоночных пальмитоил-СоА, главный продукт синтеза жирных кислот, действует по принципу обратной связи как мощный ингибитор ацетил-СоА-карбоксилазы. Цитрат служит аллостерическим активатором (рис. 11.2), увеличивающим V_{\max} .

Цитрат играет центральную роль в переключении клеточного метаболизма с потребления (окисления) метаболического топлива на хранение его в виде жирных

кислот. Когда концентрации митохондриальных ацетил-СоА и АТР увеличиваются, цитрат выводится из митохондрий. Он становится и предшественником цитозольного ацетил-СоА, и аллостерическим сигналом для активации ацетил-СоА-карбоксилазы. Цитрат же ингибирует активность фосфофруктокиназы-1, уменьшая обмен углерода в гликолизе.

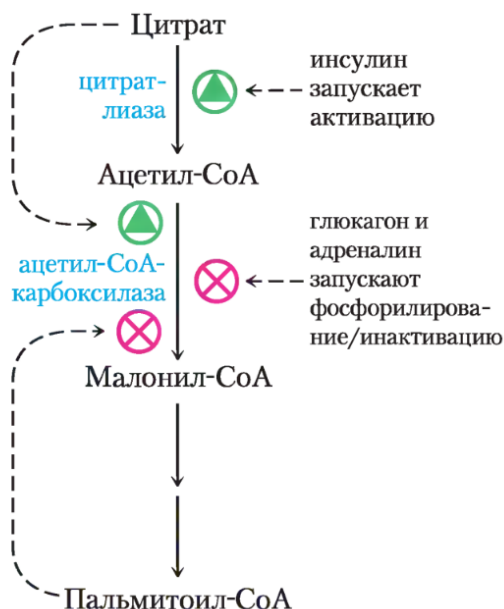


Рис. 11.2. Регуляция синтеза жирных кислот

Если бы синтез жирных кислот и β -окисление протекали одновременно, эти два процесса работали бы как бесполезный цикл с напрасной затратой энергии. Вспомним, что β -окисление блокируется под действием малонил-СоА, который ингибирует карнитинацилтрансферазу I. При этом образование первого промежуточного продукта синтеза жирных кислот малонил-СоА останавливает β -окисление на уровне транспортной системы во внутренней мембране митохондрий. Этот регуляторный механизм иллюстрирует ещё одно преимущество изоляции (сегрегации) процессов синтеза и распада в разных клеточных компартментах.

Синтез триацилглицеринов

Основные количества синтезируемых или усваиваемых организмом жирных кислот имеют две возможные судьбы: включение в триацилглицерины для сохранения метаболической энергии или образование фосфолипидных компонентов мембран. Выбор между этими альтернативными путями зависит от текущих потребностей организма. Во время быстрого роста синтез новых мембран требует производства мембранных фосфолипидов. Когда организм получает обильное питание, но активно не растёт, он направляет большую часть своих жирных кислот в жировые депо (сохраняемые жиры). Оба пути начинаются с одного и того же – образования эфиров глицерина и жирных кислот.

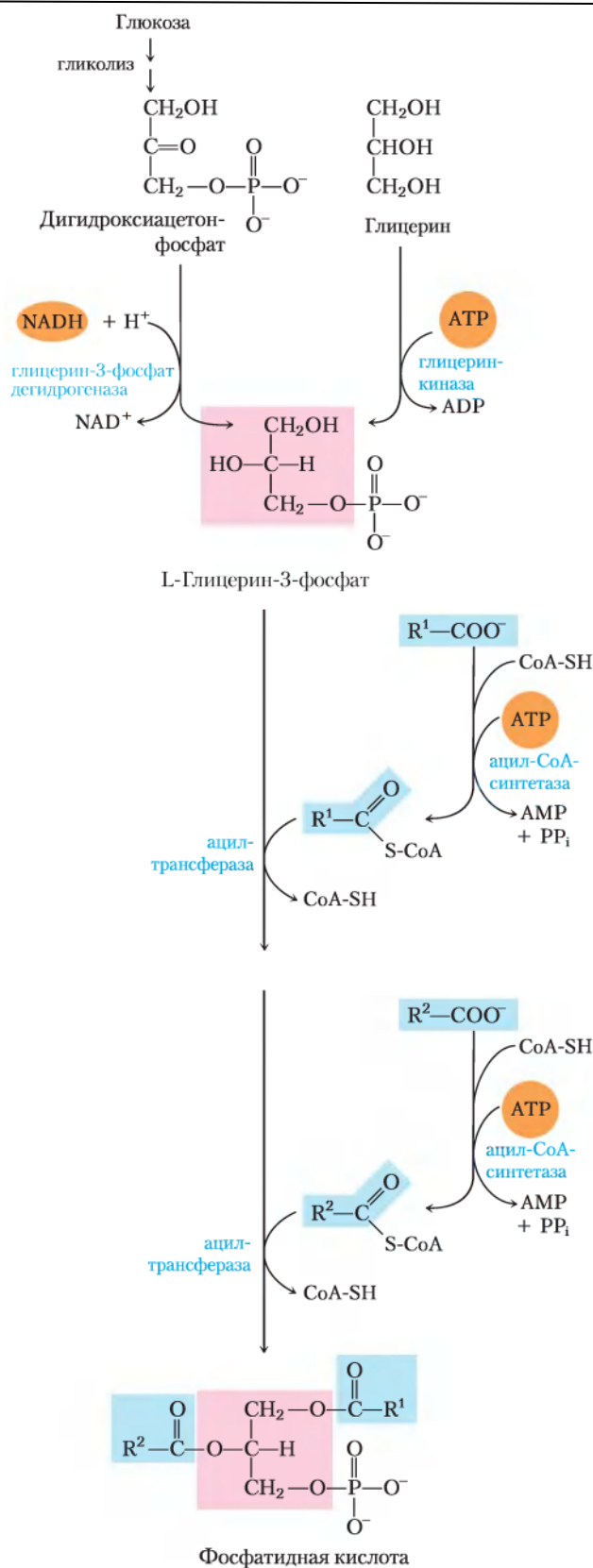


Рис. 11.3. Биосинтез фосфатидной кислоты

Животные могут синтезировать и сохранять огромные количества триацилглицеринов для последующего использования в качестве топлива. В животных тканях у триацилглицеринов и глицерофосфолипидов, например, фосфатидилэтанолamina, два общих предшественника – ацил-СоА жирных кислот и L-глицерин-3-фосфат. Они образуются в нескольких реакциях биосинтеза. Основные количества глицерин-3-фосфата получаются из промежуточного продукта гликолиза дигидроксиацетонфосфата под действием связанной с NAD глицерин-3-фосфат-дегидрогеназы. В печени и почках образуются небольшие количества глицерин-3-фосфата также из глицерина под действием глицеринкиназы (рис. 11.3). Другие предшественники триацилглицеринов – это ацил-СоА, образующиеся из жирных кислот под действием ацил-СоА-синтаз, тех же ферментов, которые отвечают за активацию жирных кислот при β-окислении (рис. 8.1).

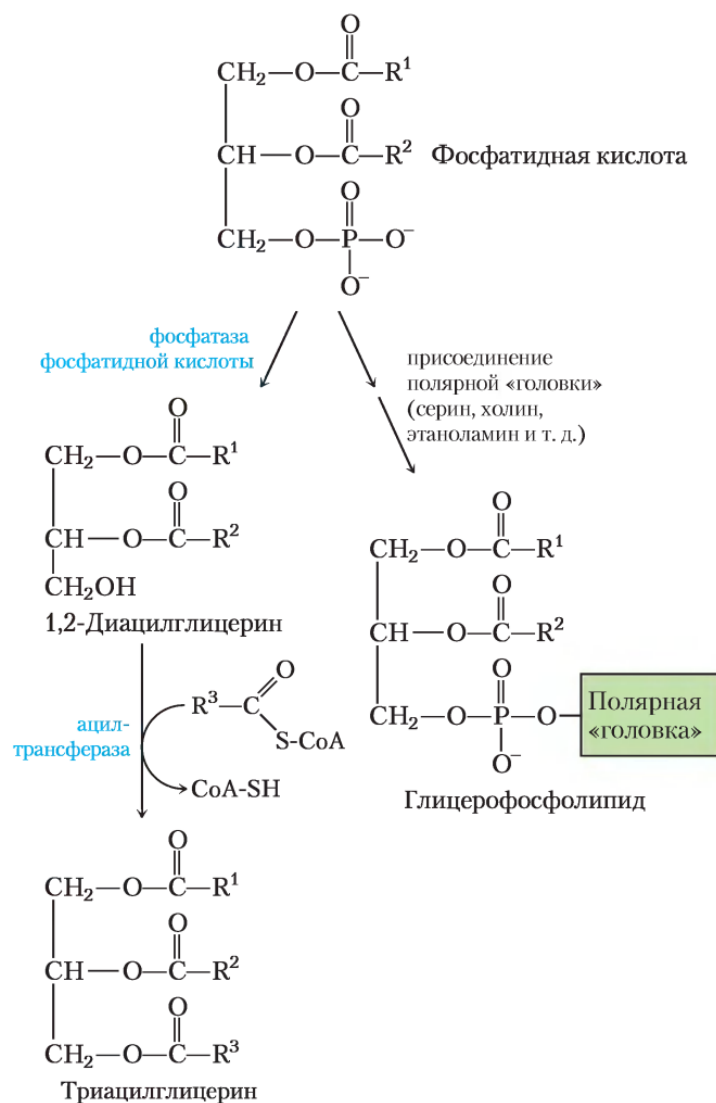


Рис. 11.4. Фосфатидная кислота в биосинтезе липидов

Первая стадия в биосинтезе триацлглицеринов – это ацилирование двух свободных гидроксильных групп L-глицерин-3-фосфата двумя молекулами ацил-СоА с образованием диацилглицерин-3-фосфата, который чаще называют фосфатидной кислотой или фосфатидатом (рис. 11.3). Фосфатидная кислота присутствует в клетках только в следовых количествах, но является центральным интермедиатом в биосинтезе липидов – она может превращаться либо в триацилглицерин, либо в глицерофосфолипид. На пути образования триацилглицеринов фосфатидная кислота гидролизуется фосфатазой фосфатидной кислоты с образованием 1,2-диацилглицерина (рис. 11.4). Затем диацилглицерины путём трансэтерификации третьей молекулой ацил-СоА превращаются в триацилглицерины.

Синтез диацилглицеринов

Стратегии синтеза

Первые стадии синтеза диацилглицеринов те же, что и при синтезе триацилглицеринов (рис. 11.3): два остатка жирной кислоты образуют сложноэфирные связи при атомах С-1 и С-2 L-глицерин-3-фосфата, давая фосфатидную кислоту. Обычно считают, что при С-1 – насыщенная жирная кислота, а при С-2 – ненасыщенная. Второй путь, приводящий к фосфатидной кислоте – фосфорилирование диацилглицеринов специфической киназой.

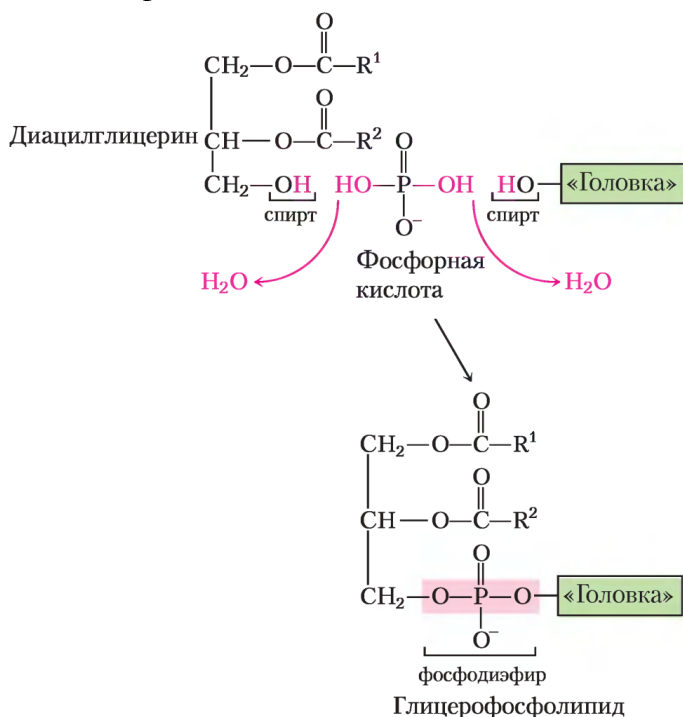


Рис. 11.5. Присоединение полярной «головки»

Полярная «головка» глицерофосфолипидов присоединяется фосфодиэфирной связью, при образовании которой каждый из двух спиртовых гидроксиллов (один на

полярной «головке», а другой на С-3 глицерина) образует сложный эфир с фосфорной кислотой (рис. 11.5).

Диацилглицерин активируется при конденсации фосфатидной кислоты цитидинтрифосфатом (СТР) с образованием CDP-диацилглицерина, при этом отщепляется пирофосфат (рис. 11.6). Затем при нуклеофильной атаке другим гидроксилем цитидинмонофосфат (CMP) замещается (рис. 11.7).

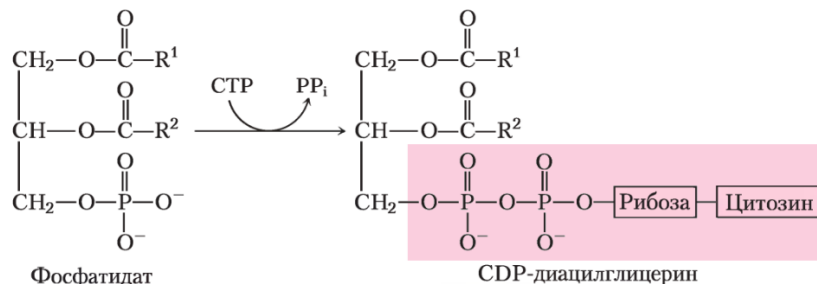


Рис. 11.6. Активация фосфатидной кислоты

CDP присоединяется либо к диацилглицерину, образуя активированную фосфатидную кислоту и CDP-диацилглицерин (стратегия 1), либо к гидроксилу «головки» (стратегия 2). Клетки эукариот используют обе стратегии, в то время как прокариоты используют только стратегию 1.

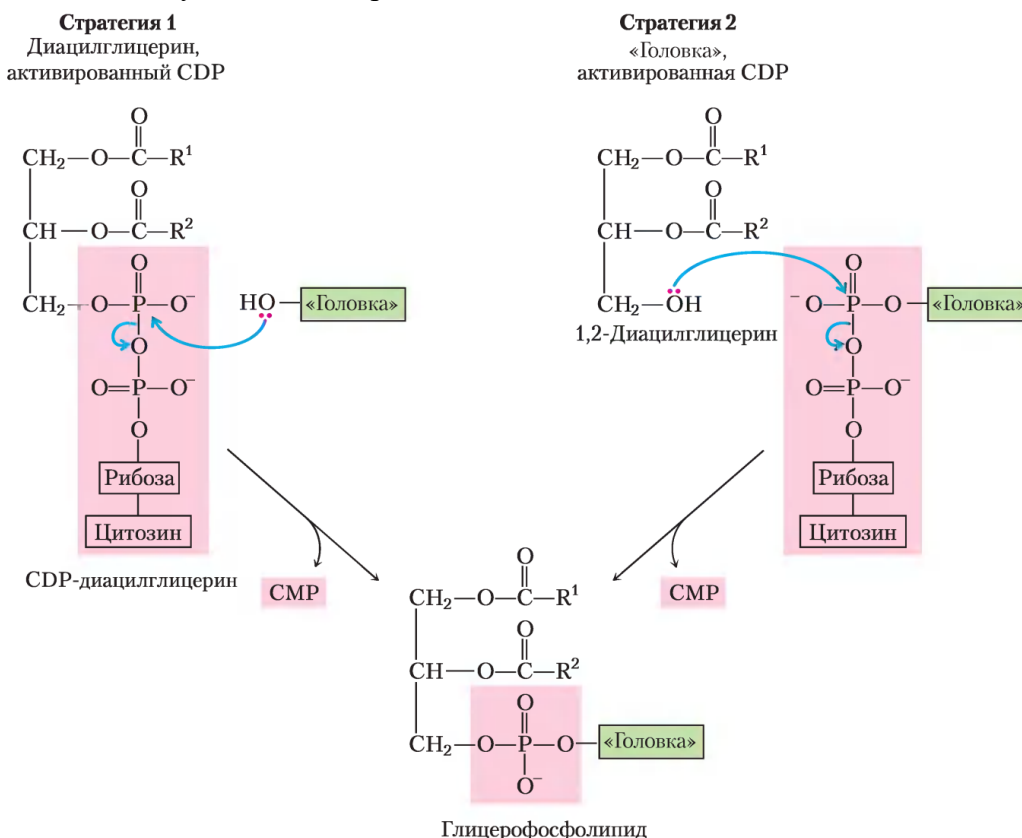


Рис. 11.7. Две главные стратегии образования фосфодиэфирной связи в фосфолипидах

Пути синтеза:

1) Спасательный – реутилизация голов

При лизисе ненужного соединения не обязательно полностью разбирать голову. Её можно очистить, активировать и снова использовать

2) Синтез *de novo* (рис. 11.8)

Серин в результате декарбоксилирования превращается в этаноламин. Фосфатидилэтанолламин может превращаться в фосфатидилхолин (лецитин) путём присоединения трёх метильных групп к аминогруппе. Донором метильных групп для всех трёх реакций метилирования служит S-аденозилметионин (на рис. 11.8: AdoMet – S-аденозилметионин, adoHcy – S-аденозилгокоцистеин).

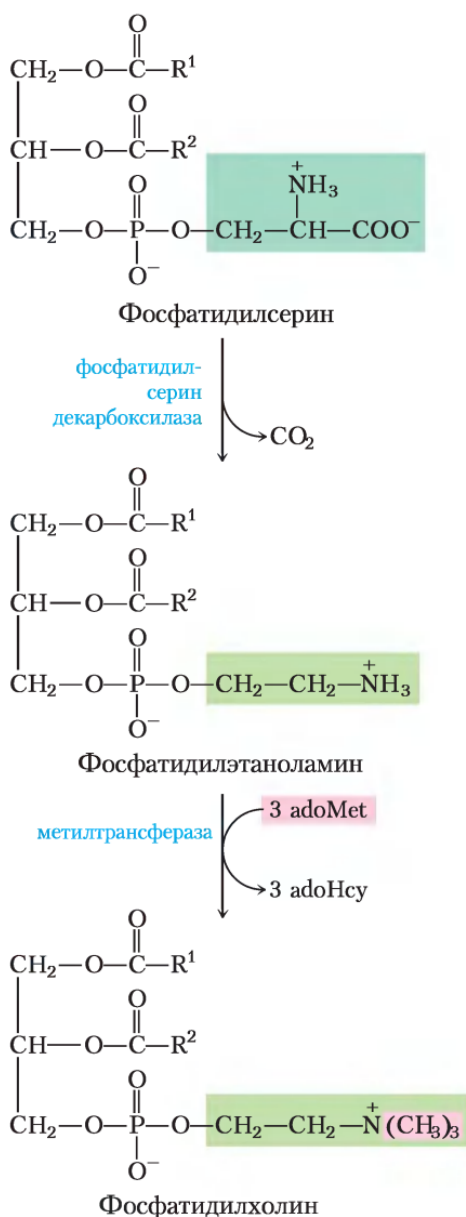


Рис. 11.8. Главный метаболический путь у всех эукариот

Синтез стероидов

Холестерин образуется из ацетил-СоА в сложной последовательности реакций (рис. 11.9) через такие интермедиаты как β-гидрокси-β-метилглутарил-СоА, мевалонат, два активированных изопрена – диметилаллилпирофосфат и изопентенилпирофосфат. Конденсация изопреновых единиц даёт нециклический сквален, который циклизуется с образованием конденсированной системы колец и боковой цепи стероида (рис. 11.10).

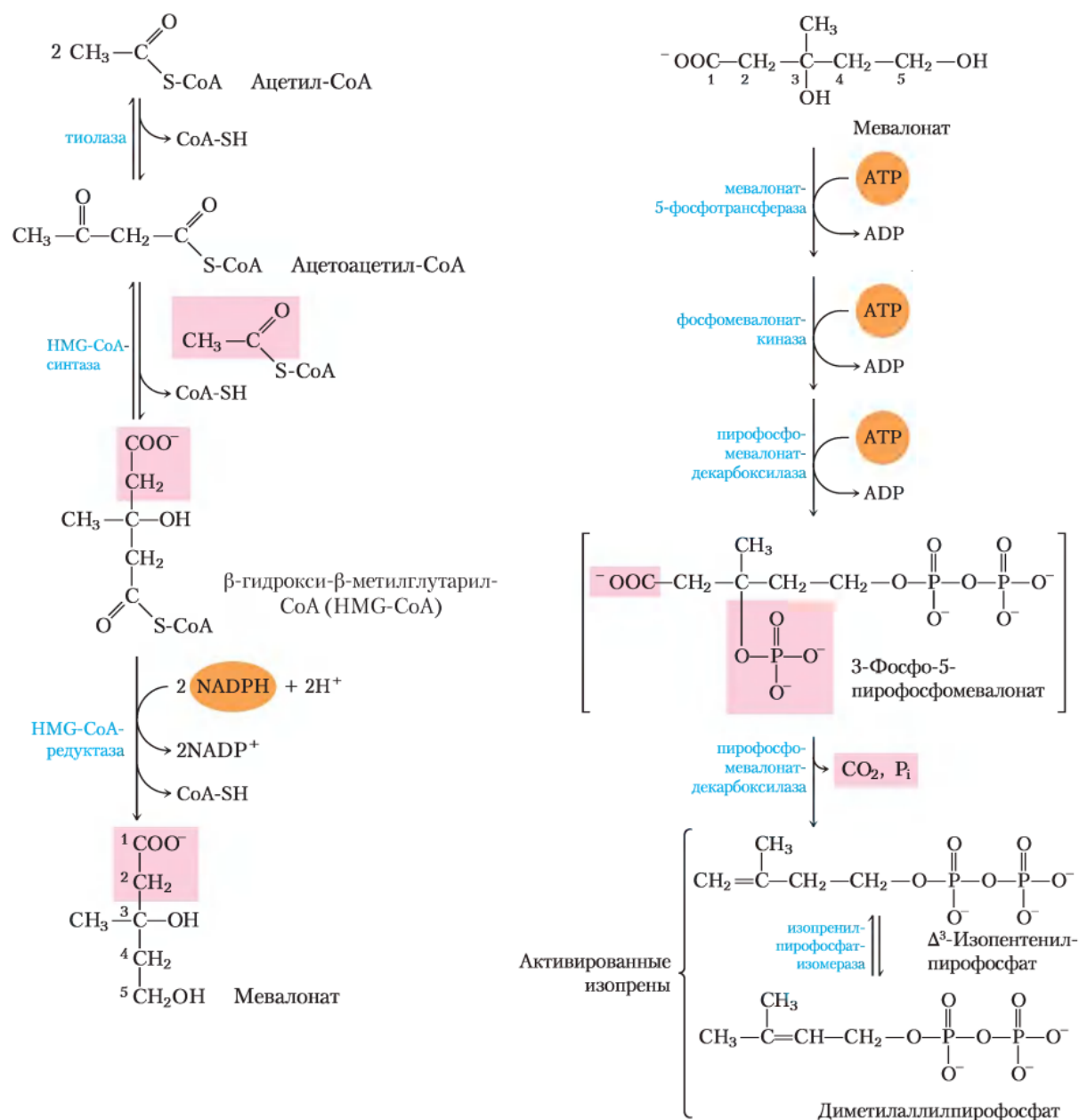


Рис. 11.9. Синтез мевалоната и его превращение в активированные изопреновые блоки

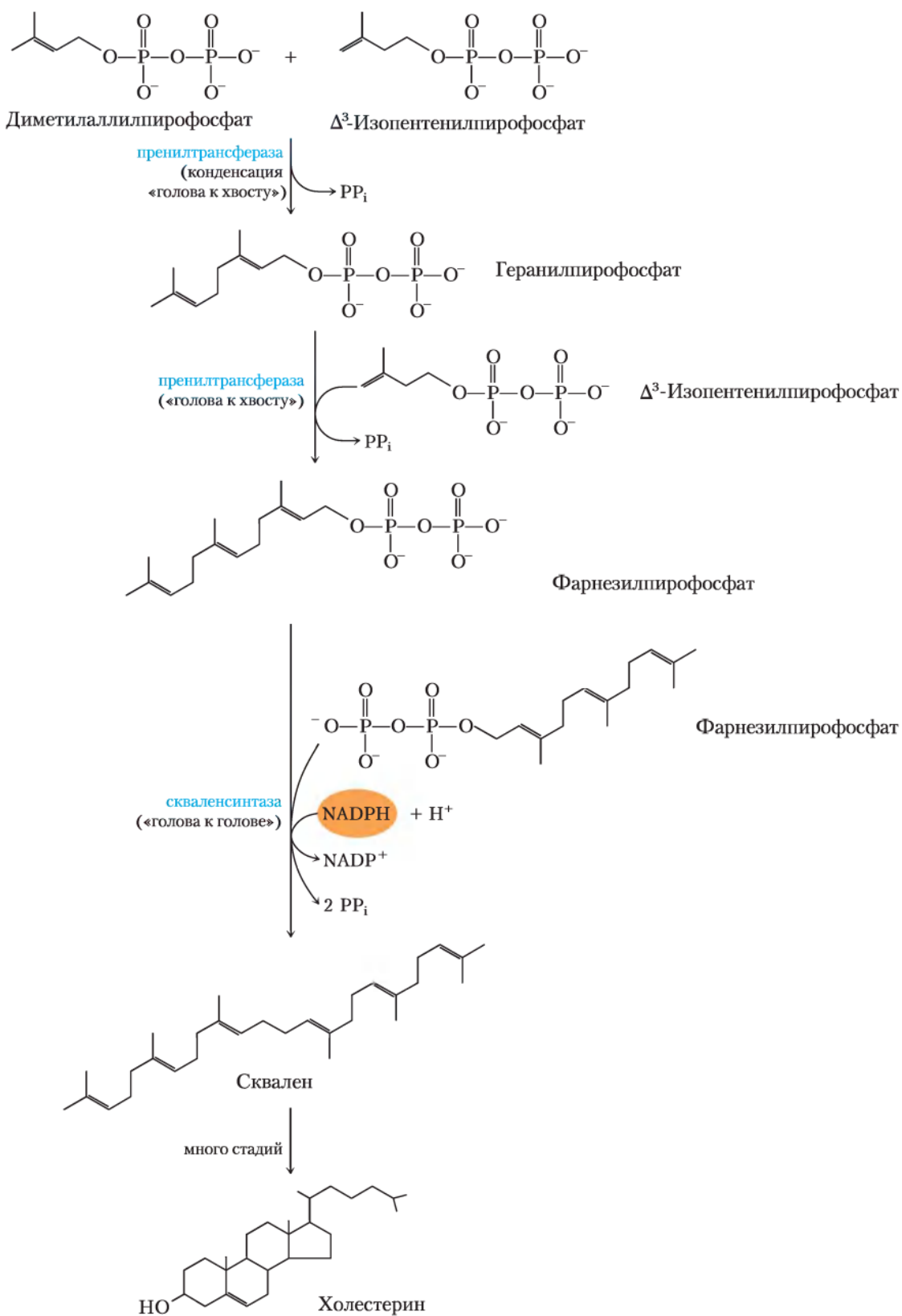


Рис. 11.10. Образование сквалена. Синтез холестерина

Лекция 12. Катаболизм аминокислот. Выведение азота

Условия метаболизма аминокислот

Вклад аминокислот, входящих в состав белков пищи или белков тканей организма, сильно различается в зависимости от типа и условий метаболизма. Хищники могут получать (сразу после поступления пищи) до 90% необходимой энергии путём окисления аминокислот, в то время как травоядные используют только небольшое количество энергии, полученной таким способом. Большинство микроорганизмов могут усваивать из питательной среды даже примеси аминокислот и использовать их в качестве топлива при определенных условиях питания. Растения же лишь очень редко окисляют аминокислоты для получения энергии. Их главный источник энергии – углеводы, которые образуются из CO_2 и H_2O при фотосинтезе. Катаболизм аминокислот происходит в растениях, но с целью образования метаболитов для других биосинтетических путей.

Аминокислоты состоят из двух частей: углеродсодержащий скелет и аминогруппа. Эти две части разделяются и обрабатываются каждая своим путём. Углеродсодержащий скелет в основном пойдёт в ЦТК, а частично в синтез жирных кислот и углеводов. Это будет зависеть от состояния организма и его физиологических потребностей. В животных клетках аминокислоты подвергаются окислительному расщеплению в трёх случаях:

1. Норма – в процессе обычного синтеза и деградации клеточных белков. Если аминокислоты, высвобождающиеся при распаде белков, не требуются для синтеза новых белков, они подвергаются окислительному расщеплению.
2. При потреблении пищи, богатой белками – количество поступающих аминокислот превосходит потребности организма для белкового синтеза, поэтому их излишек поступает в катаболические пути. Аминокислоты не могут запасаться.
3. Во время голодания или при сахарном диабете – белки клетки используются, когда углеводы либо недоступны, либо не усваиваются в качестве топлива.

Выведение азота из организма

Источником большей части аминокислот являются аминокислоты, полученные из белков пищи. Большинство аминокислот метаболизируется в печени. Аммиак, образующийся в этом процессе, перерабатывается и используется в разнообразных путях биосинтеза. Избыток аммиака либо просто выводится в виде аммония (микробы, костные рыбы), либо перед выделением превращается в мочевину (большинство наземных позвоночных) или мочевую кислоту (птицы и наземные рептилии). Углерод в мочевины и мочевой кислоте наиболее окислен. Организм выводит углерод только после извлечения максимально возможного количества энергии при его окислении.

Механизмы выведения аммиака из организма (рис. 12.1):

1. Аммиотелический – аммиак выводится напрямую в свободном виде (NH_4^+) и тут же растворяется в окружающей воде. Характерен для большинства водных организмов, таких как костные рыбы.

2. Уреотелический – аммиак выводится в виде относительно безвредной мочевины. Наземным животным для выведения азота необходимы пути, которые минимизируют токсичность и потерю воды. При больших концентрациях (6-8 М) мочевины подавляет гидрофобные взаимодействия, то есть может повредить белки. Поэтому она выходит в разбавленном виде (концентрация < 1М).

3. Урикоотелический – аммиак выводится в виде мочевой кислоты (уратов). Характерно для организмов, которым вода недоступна или не всегда доступна (птицы, ящерицы, обитатели пустынь), поскольку мочевая кислота плохо растворима. Выводится в концентрированном виде.

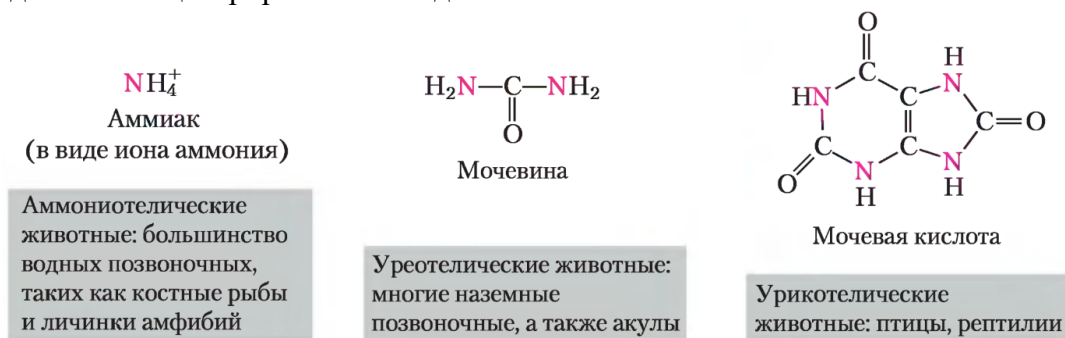


Рис. 12.1. Экскретируемые формы азота

Избыток аммиака, образующегося в других (внепеченочных) тканях, доставляется к печени в виде аминокрупп для превращения в форму, которая экскретируется.

Удаление аминокруппы. Трансаминирование

Первый и ключевой шаг в катаболизме аминокислот – это отщепление аминокруппы от углеродного скелета, которое осуществляется ферментами аминотрансферазами или трансаминазами. В этих реакциях трансаминирования α -аминокруппа переносится на α -углеродный атом α -кетоглутарата, в итоге получается α -кетокислота, аналог аминокислоты (рис. 12.2). Здесь не происходит чистого дезаминирования (потери аминокруппы), потому что α -кетоглутарат приобретает аминокруппу, а α -аминокислота её теряет. В результате реакций трансаминирования аминокруппы многие разные аминокислоты собираются в форме L-глутамата. Глутамат затем функционирует в качестве донора аминокрупп для путей биосинтеза или для экскреторных путей, которые ведут к удалению азотсодержащих ненужных продуктов.

Все аминотрансферазы несут одну и ту же простетическую группу и у них одинаковый механизм реакции. Простетической группой является пиридоксальфосфат (PLP) – это форма кофермента пиридоксина, или витамина B6.

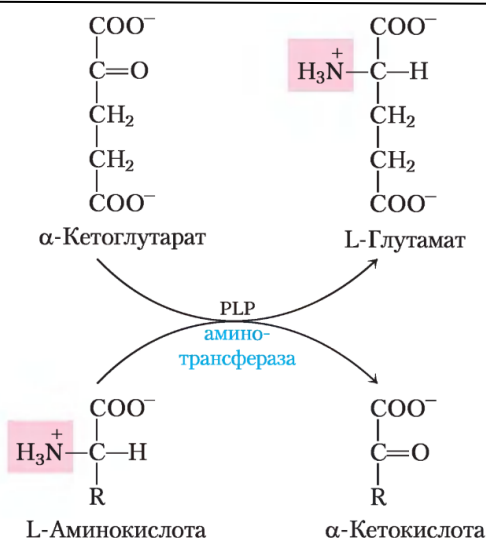


Рис. 12.2. Ферментативное трансаминирование

Пиридоксальфосфат работает как промежуточный переносчик аминогрупп в активном центре аминотрансфераз. Он обратимо переходит между альдегидной формой – пиридоксальфосфатом, который может присоединять аминогруппы, и аминированной формой – пиридоксаминфосфатом, который может быть донором аминогрупп для α -кетокислоты (рис. 12.3, а). Пиридоксальфосфат обычно ковалентно связан с активным центром фермента, образуя основание Шиффа с ϵ -аминогруппой остатка Lys (рис. 12.3, б).

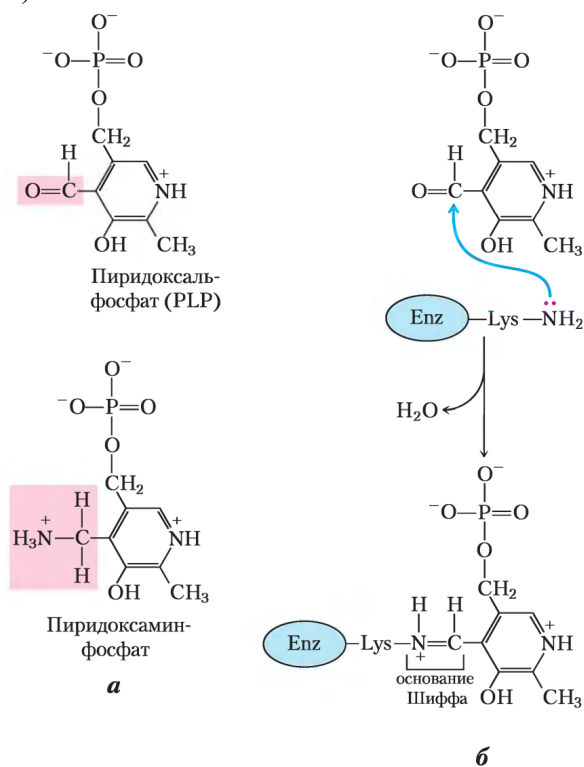


Рис. 12.3. Пиридоксальфосфат – простетическая группа аминотрансфераз

Аминотрансферазы – классический пример ферментов, катализирующих бимолекулярные реакции, которые протекают по механизму «пинг-понг» (рис. 12.4). В таких реакциях первый субстрат покидает активный центр перед тем, как с ним свяжется второй субстрат. Таким образом, приходящая аминокислота связывается с активным центром, отдаёт аминогруппу на пиридоксальфосфат и отщепляется в виде α-кетокислоты. Затем связывается следующая α-кетокислота, которая также принимает аминогруппу от пиридоксаминфосфата и вновь отщепляется в виде аминокислоты.

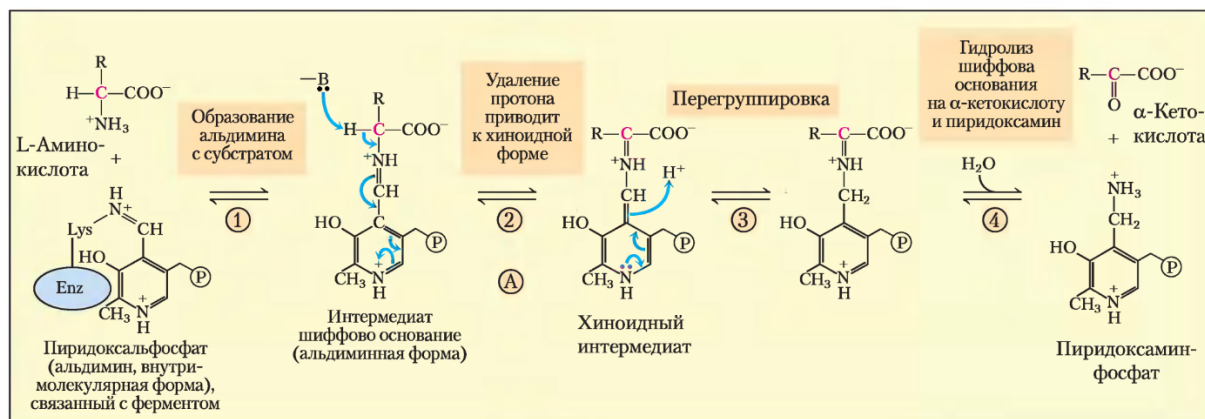


Рис. 12.4. Механизм реакции трансаминирования

Окислительное дезаминирование

Как мы рассмотрели ранее, аминогруппы большинства аминокислот собираются в печени в виде аминогрупп L-глутамата. Для того чтобы вывести аминогруппы из организма, они должны быть удалены с глутамата. В гепатоцитах глутамат транспортируется из цитозоля в митохондрии, где он подвергается окислительному дезаминированию, катализируемому L-глутаматдегидрогеназой. У млекопитающих этот фермент, присутствует в матриксе митохондрий. Это единственный фермент, который может использовать в качестве субстратов для образования восстановительных эквивалентов или NAD^+ , или NADP^+ (рис. 12.5).

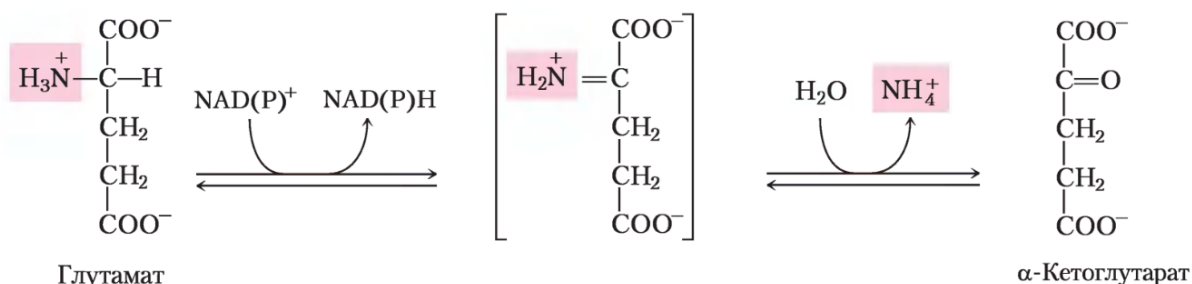


Рис. 12.5. Реакция окислительного дезаминирования

Комбинированное действие аминотрансферазы и глутаматдегидрогеназы названо трансдезаминированием. Некоторые аминокислоты минуют реакцию трансаминирования и подвергаются только окислительному дезаминированию.

У α -кетоглутарата есть коллекторная функция, которая заключается в сборе NH_3^+ - групп.

Способы транспорта аммиака

Образование аммиака в процессах катаболизма представляет собой серьёзную биохимическую проблему, поскольку для тканей животных аммиак очень токсичен. Молекулярные основы этой токсичности поняты не до конца. У человека конечные стадии интоксикации аммиаком характеризуются развитием коматозного состояния, сопровождаются отёком мозга и увеличением внутричерепного давления, поэтому исследования причины аммиачной токсичности проводятся главным образом на мозговой ткани. По одной из теорий, основной причиной аммиачной токсичности считается сильное истощение клеток мозга по АТР.

Практически во всех тканях, включая мозг, в результате таких процессов, как распад нуклеотидов, выделяется аммиак. У большинства животных почти весь свободный аммиак превращается в нетоксичное соединение до выведения его из внепечёночных тканей в кровь и дальнейшего транспорта к печени или почкам. Для этой транспортной функции глутамат, который играет ключевую роль во внутриклеточном метаболизме аминокрупп, превращается в L-глутамин. Глутамин – нетоксичная транспортная форма аммиака.

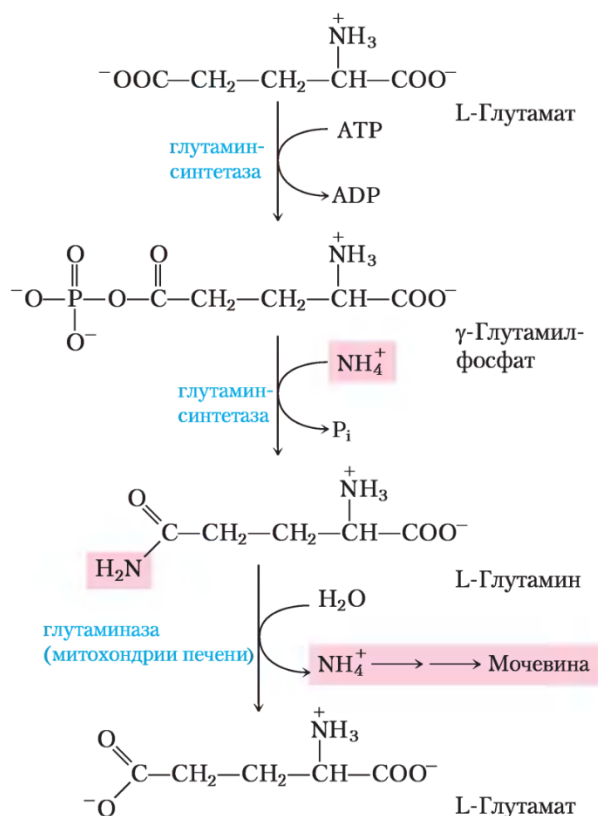


Рис. 12.6. Транспорт аммония в форме глутамина

Свободный аммиак, выделяемый тканями, соединяется с глутаматом с образованием глутамина под действием глутаминсинтетазы (рис. 12.6). Эта реакция происходит в две стадии с затратой энергии АТФ. Сначала глутамат и АТФ взаимодействуют с образованием АДФ и γ -глутамилфосфатного интермедиата, который затем вступает в реакцию с аммиаком, в результате получают глутамин и неорганический фосфат.

У большинства наземных животных избыток глутамина, который не нужен для биосинтеза, транспортируется кровотоком к кишечнику, печени и почкам для переработки. Там амидный азот высвобождается в виде иона аммония в митохондриях, где фермент глутаминаза превращает глутамин в глутамат и NH_4^+ (рис. 12.6).

Аммоний из кишечника и почек транспортируется кровотоком в печень, где участвует в синтезе мочевины. Некоторое количество глутамата, образованного в глутаминазной реакции, в дальнейшем может подвергаться действию глутаматдегидрогеназы в печени с образованием некоторого количества аммония и углеродного скелета для резервных топливных молекул. Однако основные количества глутамата вступают в реакции трансаминирования при биосинтезе аминокислот и в другие реакции.

Глюкозо-аланиновый цикл

Аланин также играет важную роль при транспортировке аминогрупп в нетоксичной форме в печень по пути, который называется глюкозо-аланиновым циклом (рис. 12.7). В мышцах и некоторых других тканях, где происходит расщепление аминокислот с целью получения энергии, аминогруппы в результате трансаминирования собираются в форме глутамата. Глутамат может превращаться в глутамин для доставки аминогрупп в печень, как было описано выше, а может при действии аланинаминотрансферазы передать свою α -аминогруппу на пируват, легко доступный благодаря происходящему в мышцах гликолизу (рис. 12.7).

Образованный таким образом аланин попадает в кровь и переносится в печень. В цитозоле гепатоцитов аминотрансфераза переносит аминогруппу аланина на α -кетоглутарат с образованием пирувата и глутамата. Глутамат может попасть в митохондрии, где в глутаматдегидрогеназной реакции высвободит NH_4^+ (рис. 12.5), а может участвовать в реакции трансаминирования с оксалоацетатом и образованием аспартата – ещё одного донора азота при синтезе мочевины.

Использование аланина для переноса аммония из скелетной мускулатуры к печени – ещё один пример экономии, свойственной живым организмам. Энергично сокращающаяся скелетная мышца получает энергию анаэробно, при гликолизе в ней образуются пируват и лактат, а при расщеплении белков – аммиак. Эти продукты должны попасть в печень, где пируват и лактат превратятся в глюкозу, которая вернется в мышцы, а аммиак превратится в мочевины для выведения. Таким образом,

энергетические затраты на глюконеогенез в большей степени осуществляются печенью, а не мышцами, и весь доступный мышцам АТФ расходуется на их сокращение.

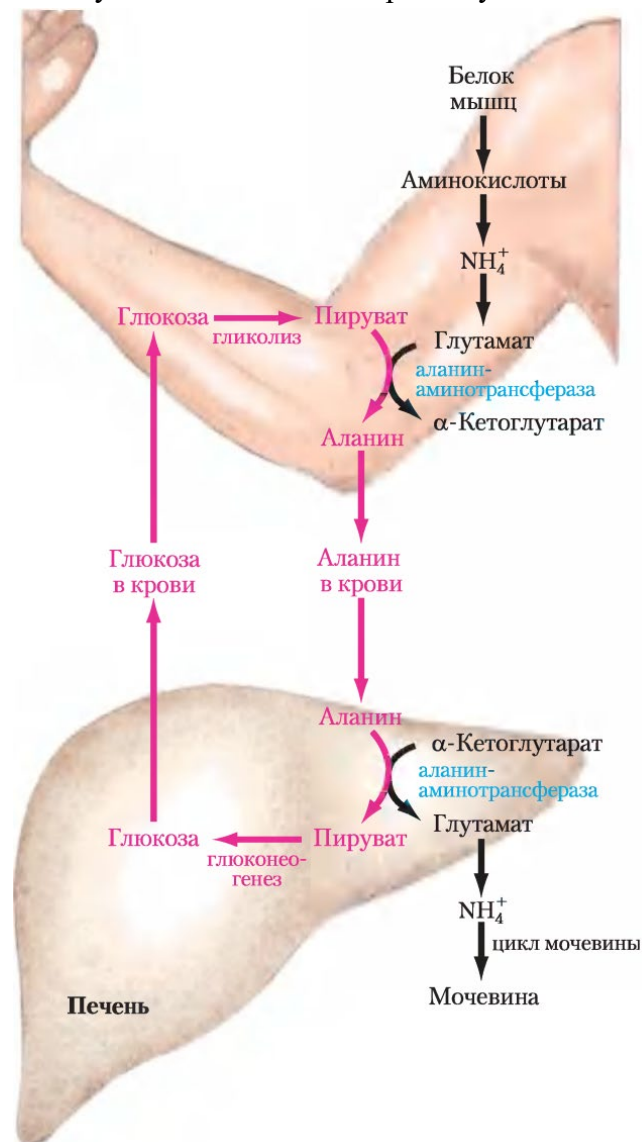


Рис. 12.7. Глюкозо-аланиновый цикл

Синтез мочевины (орнитиновый цикл)

Цикл мочевины начинается в митохондриях печени, но три последующих шага происходят в цитозоле. Цикл, таким образом, охватывает два клеточных компартмента.

Первая аминогруппа, которая попадает в цикл мочевины, образуется в митохондриальном матриксе из аммония, поступающего из путей, описанных ранее. Печень также может получать через воротную вену некоторое количество аммония из кишечника, от окисления аминокислот бактериями. Какой бы ни был у него источник, NH₄⁺, образующийся в митохондриях печени, моментально соединяется с CO₂ (в виде HCO₃⁻), выделяющимся в процессе митохондриального дыхания, в карбамоилфосфат в

матрикса. Эта АТФ-зависимая реакция катализируется регуляторным ферментом карбамоилфосфатсинтетазой I (рис. 12.8, а).

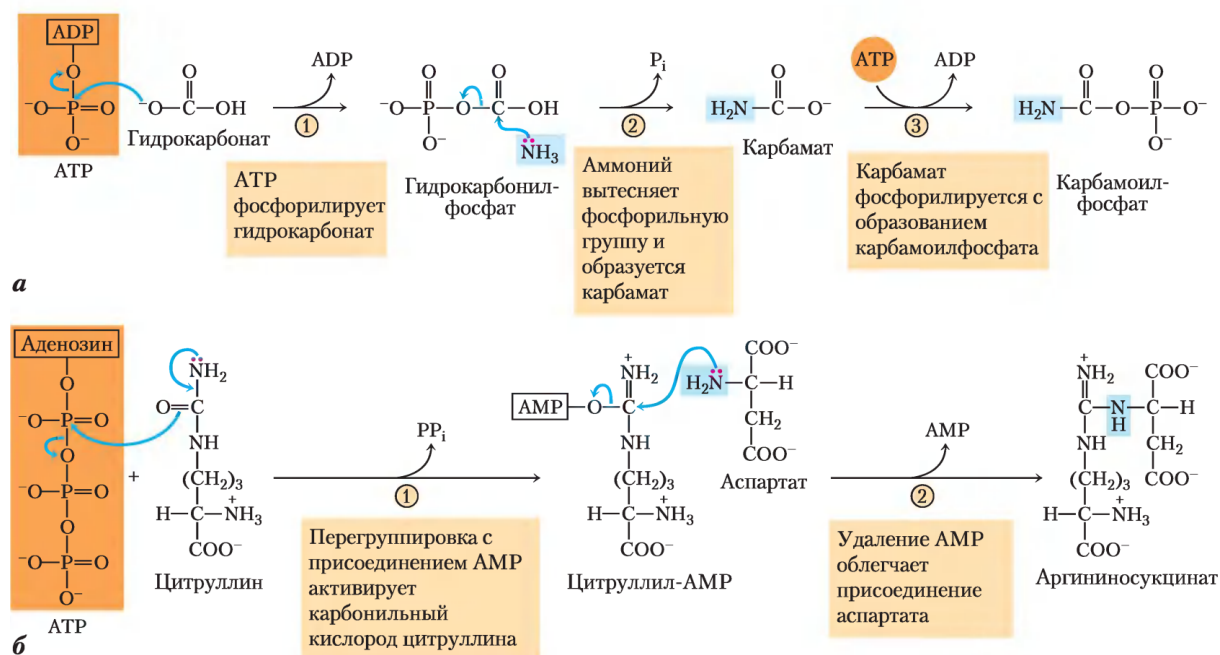


Рис. 12.8. Реакции поступления азота при синтезе мочевины.

Карбамоилфосфат, который функционирует в качестве активированного донора карбамоил-группы, теперь включается в цикл мочевины. Этот цикл состоит из четырёх ферментативных стадий (рис. 12.9):

① Карбамоилфосфат переносит карбамоил-группу на орнитин с образованием цитруллина и высвобождением P_i . Роль орнитина заключается в связывании поступающих молекул при каждом обороте цикла. Реакция катализируется орнитинтранскарбамоилазой. Образовавшийся цитруллин выходит из митохондрий в цитозоль.

② Вторая аминогруппа отщепляется от аспартата (который был образован в митохондриях при трансаминировании и транспортирован в цитозоль). В реакции конденсации между аминогруппой аспартата и уреидогруппой цитруллина образуется аргининосукцинат. Реакция катализируется аргининосукцинатсинтетазой, в ней расходуется АТФ и образуется интермедиат цитруллил-АМР (рис. 12.8, б).

③ Аргининосукцинат расщепляется аргининосукцинатлиазой с образованием свободного аргинина и фумарата, который направляется в митохондрии и пополняет пул интермедиатов цикла трикарбоновых кислот. Это единственный обратимый шаг в цикле мочевины.

④ Цитозольный фермент аргиназа расщепляет аргинин с образованием мочевины и орнитина. Орнитин транспортируется в митохондрии для инициации следующего оборота цикла.

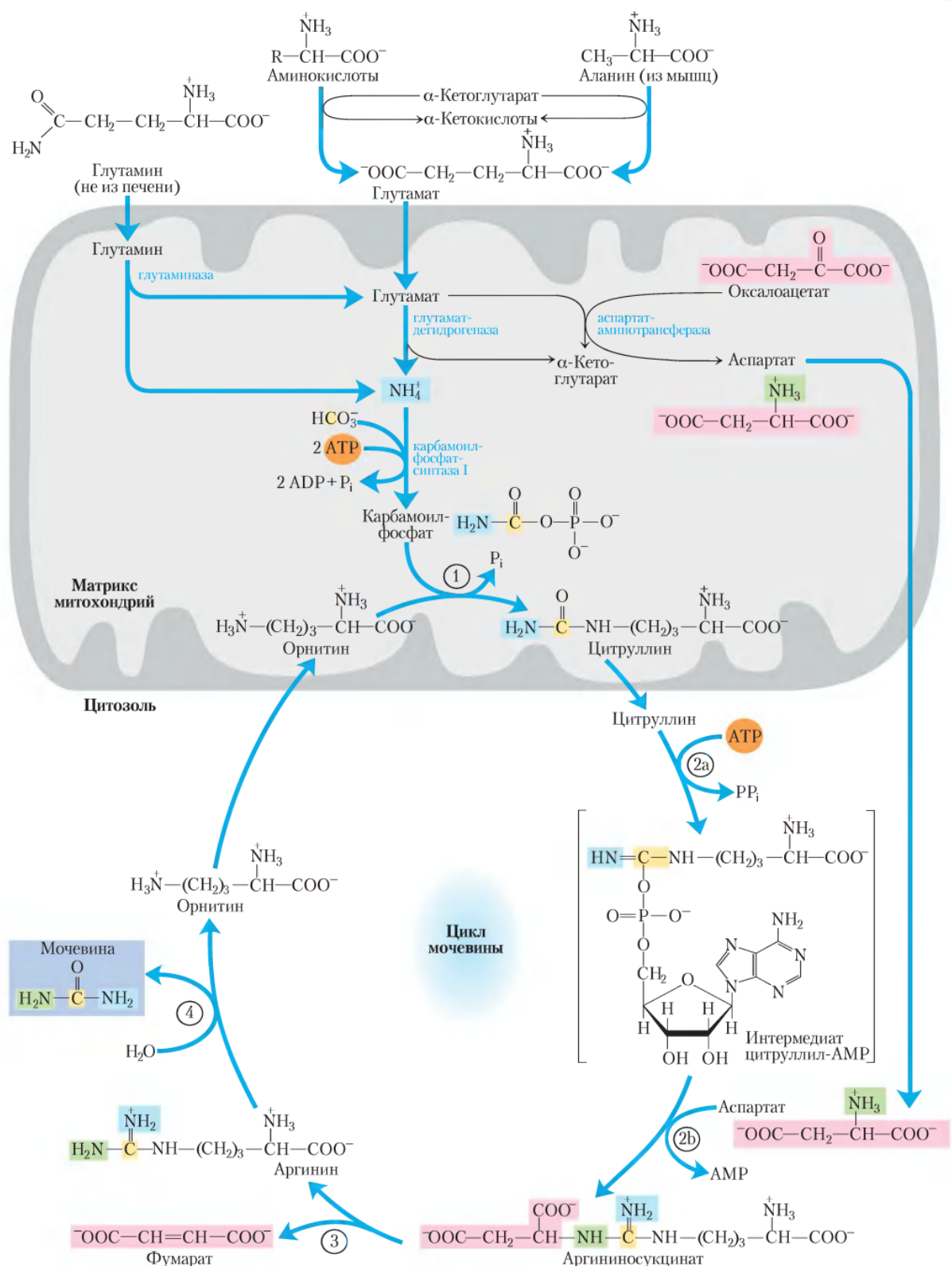


Рис. 12.9. Цикл мочевины и предшествующие реакции образованию аминогрупп

В цикле мочевины митохондриальные и цитозольные ферменты туннелируются, чтобы продукт одной ферментативной реакции непосредственно направлялся к следующему ферменту метаболического пути. Цитруллин, выходящий из митохондрий, не растворяется в общем пуле метаболитов цитозоля, а попадает строго в активный центр аргининосукцинатсинтетазы. Это туннелирование между ферментами продолжается для аргининосукцината, аргинина и орнитина. Только мочевина высвобождается в общий цитозольный пул метаболитов.

Взаимосвязь ЦТК и цикла мочевины

Фумарат, образованный в аргининосукцинатлиазной реакции (рис. 12.9, ③), является также интермедиатом в цикле лимонной кислоты. Поэтому данные циклы связаны между собой в общий процесс, который можно назвать «бициклом Кребса» (рис. 12.10). Однако каждый цикл может работать автономно и взаимодействие между ними зависит от транспорта ключевых интермедиатов между митохондриями и цитозолем.



Рис. 12.10. Взаимосвязь между циклом мочевины и циклом лимонной кислоты

Существуют изоформы нескольких ферментов цикла лимонной кислоты, включая фумаразу (фумаратгидратазу) и малатдегидрогеназу, которые присутствуют в цитозоле. Фумарат, образованный при цитозольном синтезе аргинина, может при этом превращаться в малат в цитозоле, и эти интермедиаты в дальнейшем могут метаболизироваться в цитозоле или транспортироваться в митохондрии для использования в цикле лимонной кислоты.

Аспартат, образующийся в митохондриях в реакциях трансаминирования между оксалоацетатом и глутаматом, может транспортироваться в цитозоль, где он служит донором азота в реакции цикла мочевины, которая катализируется аргининосукцинатсинтетазой. Эти аспартат-аргининосукцинатный шунт, Его реакции обеспечивают метаболические связи между путями, в которых утилизируются аминокислоты и углеродный скелет аминокислот.

Взаимосвязи путей уменьшают энергетическую цену синтеза мочевины. На синтез одной молекулы мочевины в изолированном цикле мочевины тратится четыре высокоэнергетические фосфатные группы (рис. 12.9). Для образования карбамоилфосфата необходимы две молекулы АТФ, для аргининосукцината – одна АТФ, причём последняя молекула АТФ подвергается гидролизу до АМР и P_i , который диссоциирует с образованием двух P_i .

Однако в цикле мочевины также происходит последовательное превращение оксалоацетата до фумарата (через аспартат), а при регенерации оксалоацетата в малатдегидрогеназной реакции (рис. 12.10) образуется NADH. В процессе митохондриального дыхания за счёт каждой молекулы NADH может образовываться до 2,5 молекул АТФ, что значительно снижает полную энергетическую цену синтеза мочевины.

Лекция 13. Деградация углеродного скелета

Пути деградации углеродного скелета аминокислот

Двадцать путей распада аминокислот сходятся с образованием всего шести главных продуктов, и все они попадают в цикл трикарбоновых кислот (рис. 13.1). Отсюда углеродные скелеты идут:

- в глюконеогенез
- в кетогенез (кетоновые тела могут пойти в энергию или запасаться в виде ТАГ)
- полностью окисляются до CO_2 и H_2O с получением энергии (при голодании).

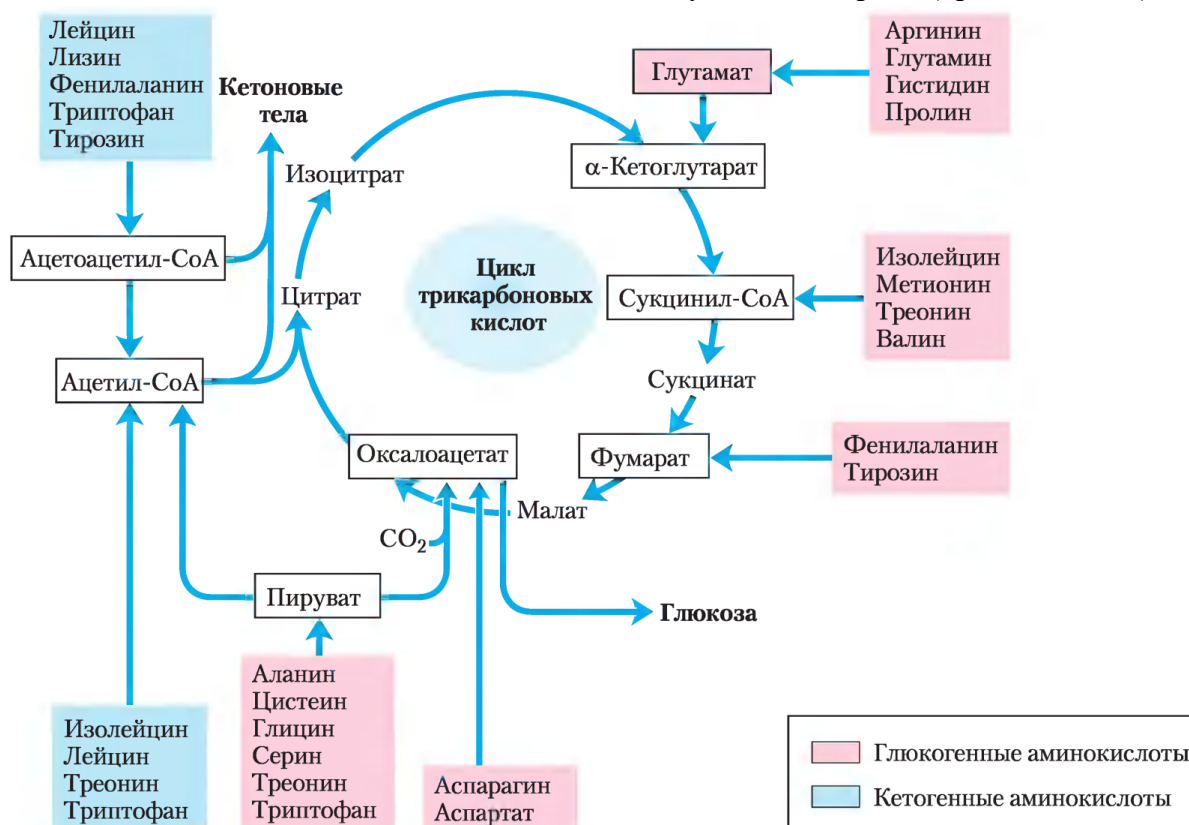


Рис. 13.1. Обзор катаболизма аминокислот

Весь или часть углеродного скелета семи аминокислот в конечном счёте разрушаются до ацетил-СоА. Пять аминокислот превращаются в α -кетоглутарат, четыре – в сукцинил-СоА, две – в фумарат и две – в оксалоацетат. Шесть аминокислот целиком или по частям превращаются в пируват, который преобразуется либо в ацетил-СоА, либо в оксалоацетат.

Некоторые аминокислоты встречаются более одного раза, что отражает разные судьбы участков углеродного скелета.

Семь аминокислот, которые разлагаются целиком или по частям до ацетоацетил-СоА и/или ацетил-СоА – это фенилаланин, тирозин, изолейцин, лейцин, триптофан,

треонин и лизин. Они могут превратиться в кетоновые тела в печени, где ацетоацетил-СоА превращается в ацетоацетат и затем в ацетон и β-гидроксибутират (рис. 10.1). Это **кетогенные** аминокислоты (рис. 13.1). Их способность образовывать кетоновые тела часто служит маркером для определения неконтролируемого диабета, при котором в печени образуется огромное количество кетоновых тел и из жирных кислот, и из кетогенных аминокислот.

Аминокислоты, которые распадаются с образованием пирувата, α-кетоглутарата, сукцинил-СоА, fumarата и/или оксалоацетата, могут превращаться в глюкозу и гликоген. Они являются **глюкогенными** аминокислотами.

Разделение на кетогенные и глюкогенные аминокислоты не строгое. Триптофан, фенилаланин, тирозин, треонин и изолейцин выполняют и кетогенные, и глюкогенные функции. Катаболизм аминокислот критичен для выживания как животных, потребляющих высокобелковую пищу, так и для голодающих животных. Лейцин – исключительно кетогенная аминокислота, широко распространённая в белках. В условиях голодания при его деградации усиливается кетоз.

Одноуглеродные переносчики

Один из типов реакций в катаболизме аминокислот – это перенос одноуглеродных фрагментов, где обычно участвует один из трёх кофакторов: биотин, тетрагидрофолат или S-аденозилметионин (рис. 13.2). Эти кофакторы переносят одноуглеродную группу в различном окисленном состоянии:

- **биотин** переносит углерод в его наиболее окисленной форме – как CO₂ (HCO₃)
- **тетрагидрофолат** (FH₄) переносит одноуглеродный фрагмент в промежуточном состоянии окисленности (-CH₂- / -CH₂OH; =CH- / -C(O)H; -CH₂-NH₃⁺; -CH₂-SH) и иногда в виде метильной группы (-CH₃)
- **S-аденозилметионин** (SAM) переносит наиболее восстановленное состояние углерода – метильную группу (-CH₃)

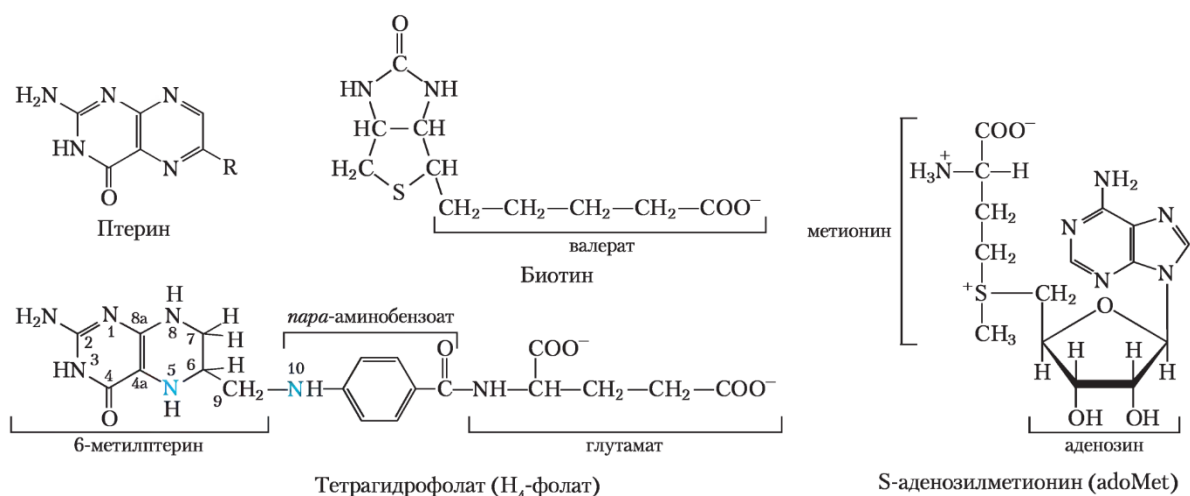


Рис. 13.2. Одноуглеродные переносчики

Последние два кофактора особенно важны в метаболизме аминокислот и нуклеотидов.

Тетрагидрофолат, синтезирующийся бактериями, состоит из замещённого птерина (6-метилптерин), пара-аминобензоата и фрагмента глутамата (рис. 13.2).

Его окисленная форма (фолат) – витамин для млекопитающих. Он может быть в две стадии превращён в тетрагидрофолат под действием фермента дигидрофолатредуктазы. Переносимая одноуглеродная группа в любом из трёх окисленных состояний связывается с атомами N-5 или N-10, или с обоими этими атомами азота. Наиболее восстановленная форма кофактора переносит метильную группу, более окисленная – метиленовую группу, а самая окисленная – остаток метинильной группы, формила или формимина (рис. 13.3).

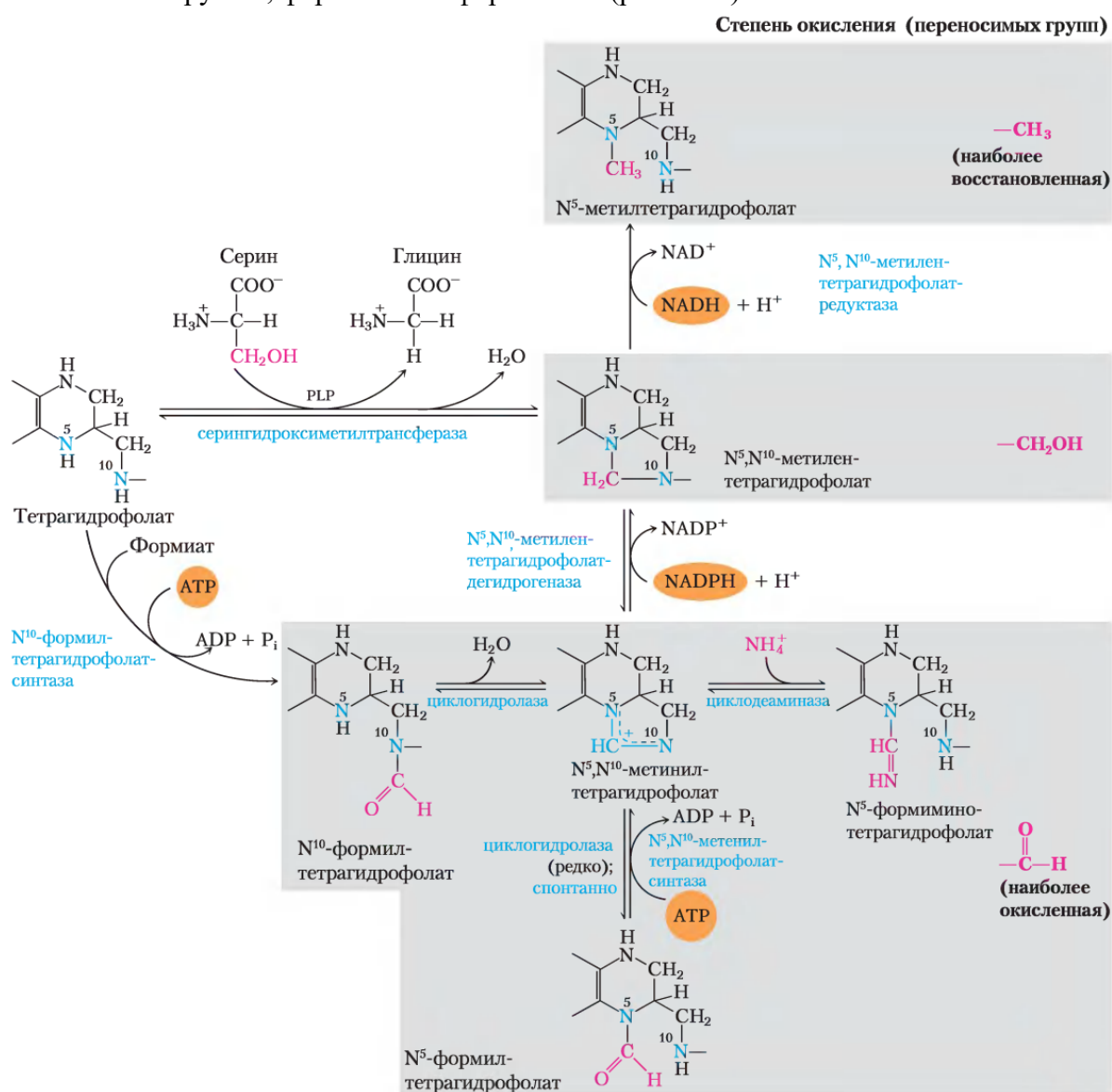


Рис. 13.3. Преобразования одноуглеродного фрагмента на тетрагидрофолате

Большинство форм тетрагидроfolата подвергаются взаимопревращениям и служат донорами одноуглеродной единицы в разнообразных метаболических реакциях. Главный источник одноуглеродных фрагментов для тетрагидроfolата – это углерод, донором которого является серин. В результате образуются глицин и N⁵, N¹⁰-метилентетрагидроfolат.

Хотя тетрагидроfolат может переносить метильную группу на атоме N-5, для осуществления большинства реакций биосинтеза энергии этой метильной группы недостаточно. В качестве переносчика метильной группы лучше подходит кофактор **S-аденозилметионин**. Он синтезируется из АТФ и метионина под действием метионинаденозилтрансферазы (рис. 13.4, стадия ①). Эта реакция необычна тем, что нуклеофильный атом серы метионина вместо атомов фосфора атакует 5'-углерод рибозы молекулы АТФ. Трифосфат высвобождается и «разрезается» на P_i и PP_i этим же ферментом, а PP_i расщепляется неорганической пирофосфатазой. Таким образом, в этой реакции разрушаются три связи, включая две связи высокоэнергетических фосфатных групп. Единственная другая известная реакция, в которой трифосфат отщепляется от АТФ, протекает при синтезе кофермента B₁₂.

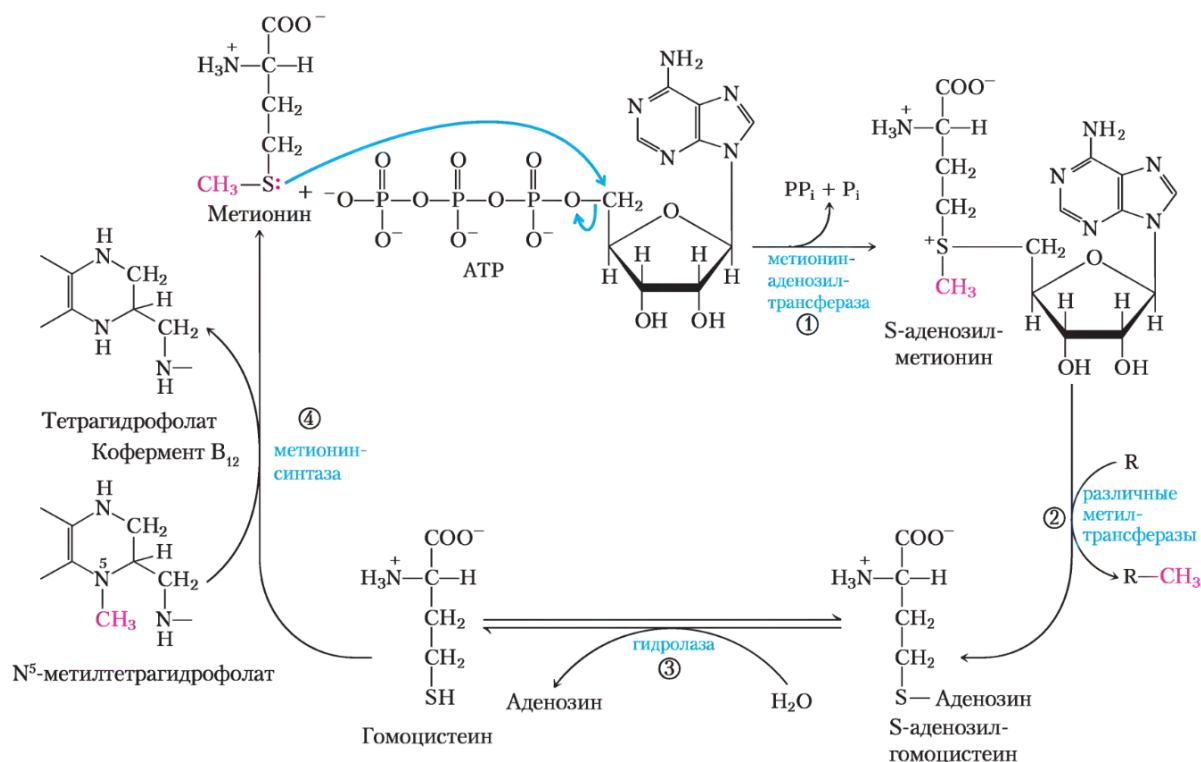


Рис. 13.4. Синтез метионина и S-аденозилметионина в метил-активированном цикле

S-Аденозилметионин – мощный алкилирующий агент благодаря дестабилизирующим свойствам его сульфониевого иона. Метильная группа S-аденозилметионина служит мишенью для нуклеофильной атаки – она в 1000 раз более реакционноспособна, чем метильная группа N⁵-метилтетрагидроfolата.

В результате переноса метильной группы с S-аденозилметионина на акцептор образуется S-аденозилгомоцистеин (рис. 13.4, стадия ②), который затем расщепляется на гомоцистеин и аденозин (стадия ③). Метионин регенерируется при переносе метильной группы на гомоцистеин в реакции, катализируемой метионинсинтазой (стадия ④). Так метионин превращается в S-аденозилметионин, что завершает цикл активации метила.

Одна из форм метионинсинтазы, общая для бактерий, использует в качестве донора метила N⁵-метилтетрагидрофолат. Другая форма фермента, присутствующая у некоторых бактерий и млекопитающих, использует N⁵-метилтетрагидрофолат, но метильная группа сначала переносится на производное кофермента B₁₂ – кобаламин. Образуется метилкобаламин, который служит донором метила при образовании метионина. Эта реакция и перегруппировка L-метилмалонил-КоА до сукцинил-КоА – это единственные известные у млекопитающих реакции, зависящие от кофермента B₁₂.

Катаболизм простейших аминокислот

Углеродные скелеты шести аминокислот (аланин, триптофан, цистеин, серин, глицин и треонин) целиком или частично превращаются в пируват. Пируват может образовывать либо ацетил-КоА и рано или поздно окисляться в цикле трикарбоновых кислот, либо оксалоацетат и поступать в глюконеогенез.

Аланин просто превращается в пируват в реакции трансаминирования с α-кетоглутаратом, а боковая цепь **триптофана** отщепляется в виде аланина, а значит, в итоге пирувата. **Цистеин** перегруппировывается в пируват в две стадии: сначала удаляется атом серы, а затем происходит трансаминирование. **Серин** превращается в пируват под действием сериндегидратазы. В этой пиридоксальфосфат-зависимой реакции удаляются и β-гидроксил, и α-аминогруппа серина.

Глицин превращается в серин путём ферментативной реакции присоединения гидроксиметильной группы. Для этой реакции, катализируемой серин-гидроксиметилтрансферазой, необходимы коферменты тетрагидрофолат и пиридоксальфосфат. Серин переводится в пируват, как было описано выше. По второму пути, который у животных встречается чаще, глицин подвергается окислительному расщеплению до CO₂, NH₄⁺ и метиленовой группы (-CH₂-). Для этой легко обратимой реакции, катализируемой глицинсинтазой (глицинрасщепляющим ферментом), также необходим тетрагидрофолат, который принимает метиленовую группу. В этом пути окислительного расщепления два атома углерода не попадают в цикл трикарбоновых кислот. Один атом теряется в виде CO₂, а второй превращается в метиленовую группу N⁵, N¹⁰-метилтетрагидрофолата (рис. 13.3), который в определенных путях биосинтеза выступает как донор одноуглеродного фрагмента.

Один из путей распада **треонина** ведёт к образованию пирувата через глицин. Превращение до глицина происходит в две стадии, при этом сначала под действием треониндегидрогеназы треонин превращается в 2-амино-3-кетобутират.

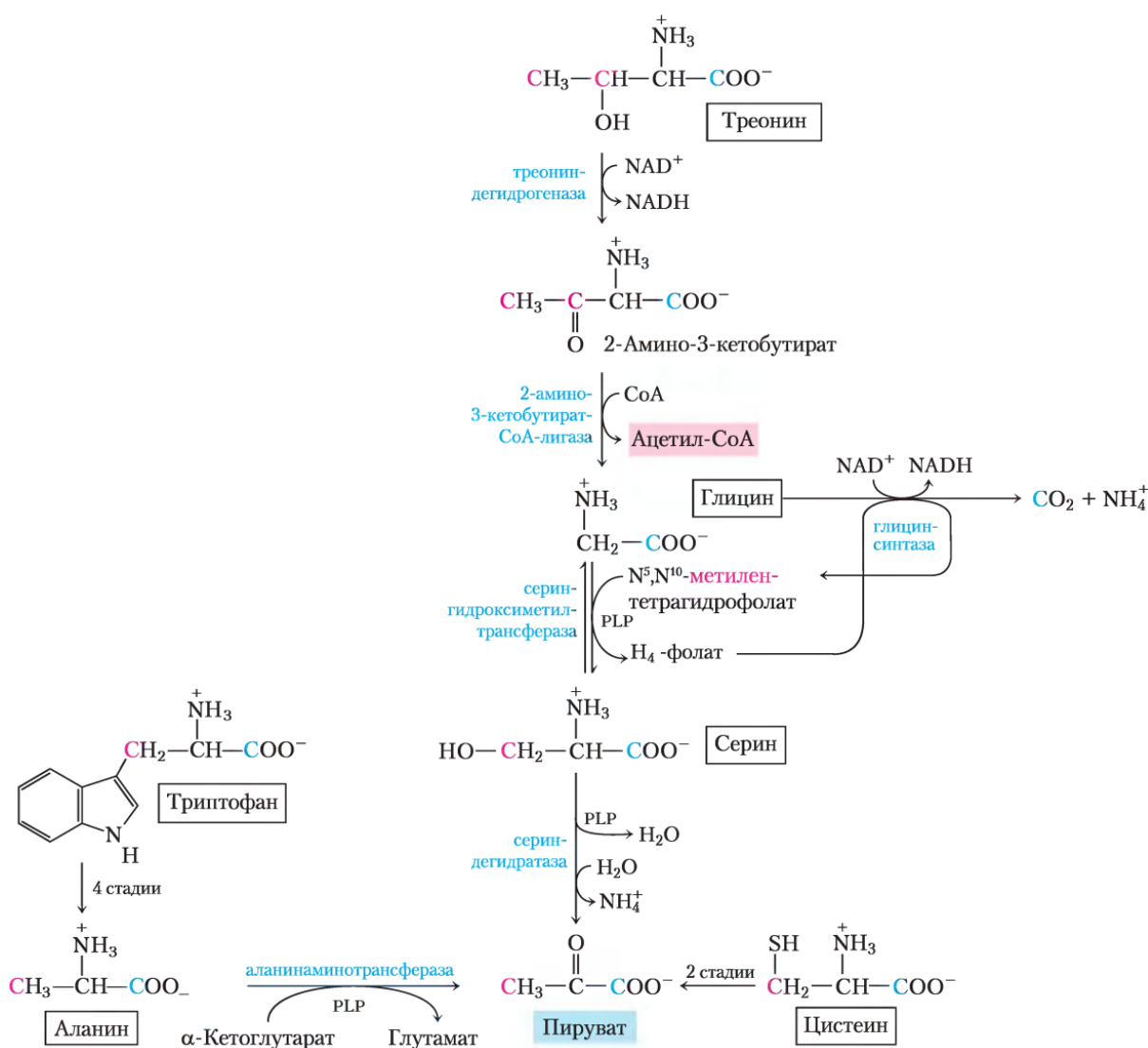


Рис. 13.5. Катаболизм аланина, глицина, серина, цистеина, триптофана и треонина

Катаболизм фенилаланина и тирозина

1. В ходе реакции гидроксилирования фенилаланин превращается в тирозин. Дефекты в гене фенилаланингидролазы (фермента, катализирующего данную реакцию) вызывают болезнь фенилкетонурию – наиболее распространённую причину повышенного уровня фенилаланина.

Фенилаланингидроксилаза (фенилаланин-4-монооксигеназа) принадлежит к одному из основных классов ферментов, которые называются оксидазами со смешанными функциями. Они катализируют спонтанное гидроксилирование субстрата одним атомом кислорода молекулы O_2 с восстановлением другого атома до H_2O . Фенилаланингидроксилаза использует в качестве кофактора тетрагидробиоптерин, который переносит электроны с NADH на O_2 и окисляется в этом процессе до

дигидробиоптерина. Впоследствии он восстанавливается ферментом дигидробиоптеринредуктазой в реакции, для которой необходим NADH.

При фенилкетонурии активируется вторичный малоиспользуемый в норме путь метаболизма фенилаланина. В этом пути фенилаланин подвергается трансаминированию с пируватом с образованием фенилпирувата. Фенилаланин и фенилпируват накапливаются в крови и тканях и выделяются с мочой. Большая часть фенилпирувата вместо того, чтобы выводиться, либо декарбоксилируется до фенилацетата, либо восстанавливается до фениллактата. Накопление фенилаланина или его метаболитов в раннем возрасте ухудшает нормальное развитие мозга, вызывая серьезную задержку в умственном развитии.

Фенилкетонурия – одно из первых наследственных нарушений метаболизма, обнаруженных у людей. Если эту проблему распознать в раннем детстве, развитие умственной отсталости можно предотвратить строго контролируемой диетой. В пище должно содержаться только необходимое для синтеза белков количество фенилаланина и тирозина.

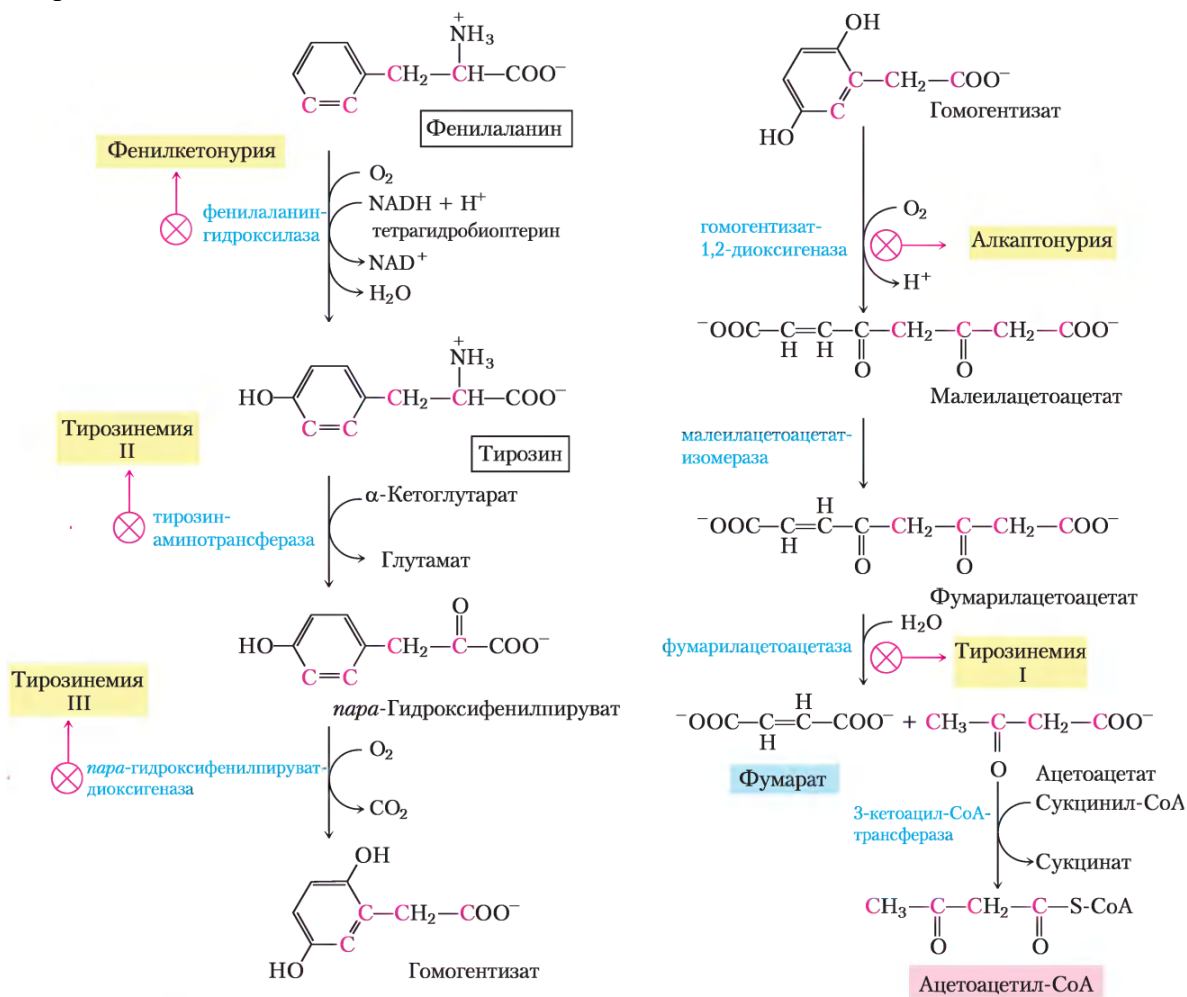


Рис. 13.6. Катаболические пути фенилаланина и тирозина

2. Трансаминирование тирозина с α -кетоглутаратом катализирует фермент тирозинаминотрансфераза. В результате образуется *para*-гидроксифенилпируват.

3. В реакции окисления *para*-гидроксифенилпирувата в гомогентизат происходит декарбоксилирование, гидроксилирование ароматического кольца и миграция боковой цепи. Реакцию катализирует фермент *para*-гидроксифенилпируватдиоксигеназа.

4. Превращение гомогентизата в фумарилацетоацетат сопровождается расщеплением ароматического кольца. Эта реакция катализируется ферментом гомогентизат-1,2-диоксигеназа. В результате разрыва бензольного кольца образуется малеилацетоацетат, который в процессе изомеризации превращается в фумарилацетоацетат.

5. Гидролиз фумарилацетоацетата при действии фумарилацетоацетазы приводит к образованию фумарата и ацетоацетата.

Лекция 14. Анаболизм аминокислот

Круговорот азота в биосфере

Воздух – самый важный источник азота, так как он на 4/5 состоит из молекулярного азота (N_2). Тем не менее, существует очень мало биологических видов, способных превращать атмосферный азот в соединения, доступные для живых организмов. В биосфере разные виды связаны между собой, кроме всего прочего, через протекающие в них метаболические процессы. Поэтому в круговороте (природном цикле) азота он постоянно образуется и утилизируется (рис. 14.1).

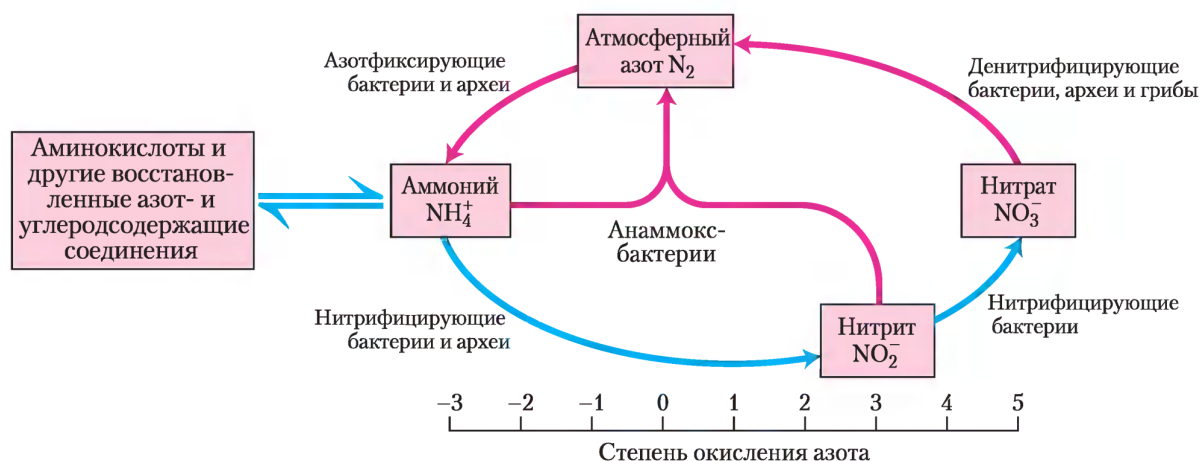


Рис. 14.1. Цикл азота

Первая стадия этого цикла – фиксация атмосферного азота азотфиксирующими бактериями – восстановление молекулярного азота до аммиака или ионов аммония (NH_3 или NH_4^+). Этот процесс идёт под действием фермента нитрогеназа. В качестве кофактора выступает не только железо, но и молибден. Многие организмы не могут усваивать аммиак, а вот широко распространённые почвенные нитрифицирующие бактерии получают даже энергию от процесса окисления аммиака в нитриты (NO_2^-) и далее в нитраты (NO_3^-). Благодаря их активности почти весь попадающий в почву при фиксации азот превращается в нитраты. Этот процесс называется **нитрификация**.

Растения и многие бактерии могут поглощать и нитриты, и нитраты и быстро восстанавливать их под действием нитрит- и нитратредуктаз до аммиака, который у растений включается в состав аминокислот. Затем животные используют растения в пищу как источник заменимых и незаменимых аминокислот для синтеза собственных белков. Когда организм погибает, белки разрушаются до аммиака под действием микроорганизмов почвы, где нитрифицирующие бактерии снова превращают его в нитриты и нитраты.

Баланс между фиксированным и атмосферным азотом поддерживается бактериями, которые в анаэробных условиях превращают нитрат в N_2 . Этот процесс называется **денитрификация** (рис. 14.1). Почвенные бактерии используют в качестве

конечного акцептора электронов NO_3^- вместо O_2 в целом ряде реакций (таких как окислительное фосфорилирование), создающих трансмембранный градиент протонов, который используется для синтеза АТФ.

Недавно были открыты бактерии, способные осуществлять окисление аммиака в анаэробных условиях (рис. 14.1). Этот процесс получил название **анаммокс** (англ. *anammox* – *anaerobic ammonia oxidation*) – происходит превращение аммиака и нитрита в N_2 . В биосфере превращение NH_3 в N_2 на 50-70% происходит именно по этому метаболическому пути, открытому лишь в 1980-х гг. облигатные анаэробы, осуществляющие анаммокс, интересны сами по себе и, кроме того, позволяют решить некоторые проблемы, связанные с очисткой сточных вод.

Процесс анаммокс

Энергия, необходимая для существования живых организмов, связана с созданием градиента ионов водорода на мембранах. Электроны от восстановленного субстрата доставляются к переносчикам электронов в мембранах и после серии переходов попадают к конечному акцептору электронов. В результате этого на одной стороне мембраны накапливаются протоны – возникает протонный градиент. Этот градиент используется для синтеза АТФ или для осуществления других энергозатратных процессов в клетке. У всех эукариот восстановленным субстратом обычно являются углеводы (глюкоза или пируват), а в роли акцептора электронов выступает кислород.

Метаболизм бактерий и архей гораздо более гибкий. В анаэробных условиях, например, в донных отложениях морей и пресноводных водоемов, разнообразие жизненных стратегий весьма велико. Практически любая окислительно-восстановительная пара может служить источником энергии для специализированного организма или группы организмов. Анаэробные организмы умеют приспосабливаться к условиям окружающей среды. Их метаболические процессы включают множество интереснейших реакций и протекают с участием специализированных кофакторов, не встречающихся в мире облигатных аэробных организмов.

Цикл азота связан с деятельностью целого ряда специализированных бактерий. Выделяют две группы нитрифицирующих бактерий: бактерии, которые окисляют аммиак до нитритов, и бактерии, которые окисляют образующиеся нитриты до нитратов (рис. 14.1). Нитрат – второй после кислорода биологический акцептор электронов. Многие бактерии и археи могут катализировать денитрификацию нитратов до азота, который азотфиксирующие бактерии затем вновь превращают в аммиак. Аммиак – главное загрязняющее вещество в составе сточных вод и отходов животноводческих ферм. Он также является побочным продуктом при производстве удобрений и при переработке нефти. На водоочистных предприятиях для превращения аммиака сточных вод в атмосферный азот «работают» сообщества нитрифицирующих

и денитрифицирующих бактерий. В этом процессе расходуется кислород и органические соединения.

В 1960-1970-х гг. появилось несколько публикаций, где выдвигалась версия, что аммоний может окисляться до азота в анаэробных условиях при использовании нитрита в качестве акцептора электронов. Этот процесс получил название анаммокс. В середине 1980-х гг. на водоочистном сооружении в Нидерландах были обнаружены бактерии, осуществляющие этот процесс. Вскоре оказалось, что это редкий тип бактерий планктомицетов.

Постепенно прояснялись биохимические механизмы, лежащие в основе процесса анаммокс (рис. 14.2). Выяснилось, что промежуточным продуктом реакций является гидразин (N_2H_4) – активное химическое соединение, которое используют даже в составе ракетного топлива. Молекулы этого вещества, имеющие небольшой размер, очень токсичны и легко проникают через фосфолипидные мембраны. Бактерии, осуществляющие анаммокс, решают эту проблему, заключая гидразин в специализированные органеллы – анаммоксосомы.

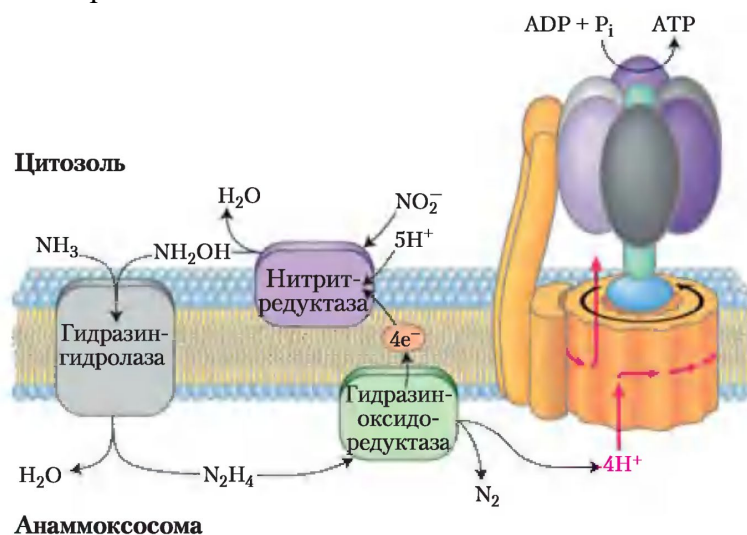


Рис. 14.2. Реакции процесса анаммокс

Аммиак и гидроксид аммония превращаются в гидразин и H_2O под действием гидразингидролазы, а затем гидразин окисляется гидразиноксидоредуктазой с образованием N_2 и протонов. Возникает градиент протонов для синтеза АТФ. На внешней стороне анаммоксосомы протоны используются нитритредуктазой, образующей оксид азота и завершающей весь цикл. Все участвующие в этом процессе ферменты окружены мембраной анаммоксосомы.

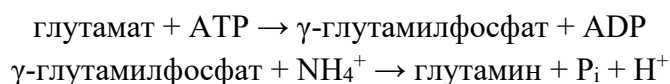
В настоящий момент бактерии, осуществляющие анаммокс, активно применяются при очистке сточных вод. Это позволяет на 90% снизить расходы на удаление аммиака (обычная стадия денитрификации полностью исключается, а расходы на аэрацию и нитрификацию снижаются) и уменьшить выход побочных продуктов.

Анаболизм аминокислот. Биосинтез глутамата и глутамина

Только некоторые бактерии и археи могут фиксировать атмосферный азот. Первый важный продукт в цепи фиксации азота – аммиак, который может быть использован всеми организмами либо непосредственно, либо после его превращения в другие растворимые соединения, такие как нитриты, нитраты или аминокислоты.

Восстановленный азот в виде NH_4^+ включается в аминокислоты, а затем в другие азотсодержащие биомолекулы. Эту ключевую точку фиксации азота обеспечивают две аминокислоты – глутаминовая кислота и глутамин. Эти две аминокислоты играют центральную роль в катаболизме аммиака и аминокислот при окислении аминокислот. Особенно важен для синтеза аминокислот глутамат, потому что он поставляет NH_4^+ через трансаминирование.

Пути биосинтеза глутаминовой кислоты и глутамина простые. Все или хотя бы некоторые их стадии обнаружены у всех организмов. Наиболее важный путь включения аммиака в глутаминовую кислоту требует протекания двух реакций. Во-первых, глутаминсинтетаза катализирует реакцию между глутаматом и NH_4^+ с образованием глутамина. Эта реакция протекает в две стадии с образованием промежуточной связанной с ферментом формы γ -глутамилфосфата (рис. 12.6):



Суммарное уравнение:



У бактерий и растений глутамат получается из глутамина в реакции, катализируемой глутаматсинтазой. α -Кетоглутарат, промежуточный продукт цикла лимонной кислоты, подвергается восстановительному аминированию с глутамином в качестве донора азота:



Суммарная реакция, осуществляемая глутаминсинтетазой и глутаматсинтазой:



Глутаматсинтаза отсутствует у животных, которые поддерживают высокий уровень глутамата за счет таких процессов, как трансаминирование α -кетоглутарата при катаболизме аминокислот.

Глутамат может быть получен и в результате другого, не так часто используемого пути: по реакции между α -кетоглутаратом и NH_4^+ , протекающей в одну стадию. Она катализируется L-глутаматдегидрогеназой – ферментом, который есть у всех организмов. Восстановительный потенциал обеспечивает NAD(P)H :



Эта реакция была рассмотрена в разделе, посвященном катаболизму аминокислот (рис. 12.5). В эукариотических клетках L-глутаматдегидрогеназа

локализована в митохондриальном матриксе. Равновесие реакции сдвинуто в сторону реагентов, а для NH_4^+ константа Михаэлиса такая высокая, что, вероятно, эта реакция вносит очень скромный вклад во включение NH_4^+ в аминокислоты и другие метаболиты. Достаточно высокие концентрации NH_4^+ с тем, чтобы реакция глутаматдегидрогеназы вносила существенный вклад в уровень глутамата, обычно наблюдаются, когда в почву добавлен NH_3 или организмы растут в лаборатории в присутствии высоких концентраций аммиака. В общем, у почвенных бактерий и растений преобладает двухферментный путь, рассмотренный выше.

Биосинтез заменимых аминокислот

Все аминокислоты образуются из интермедиатов гликолиза, цикла трикарбоновых кислот или пентозофосфатного пути (рис. 14.3).

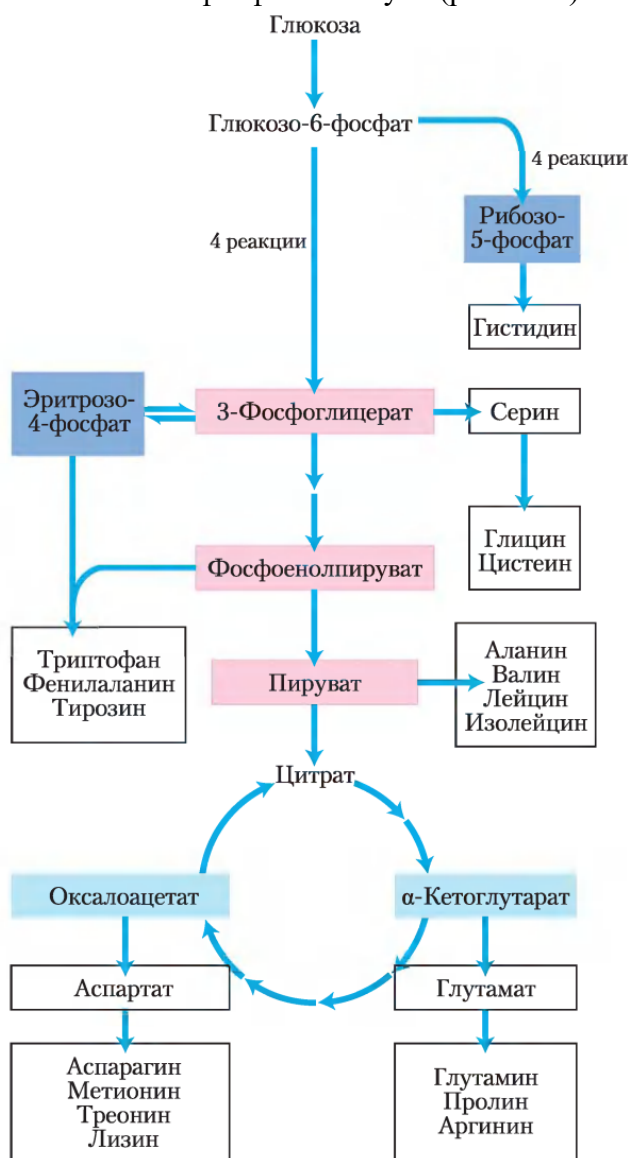


Рис. 14.3. Обзор биосинтеза аминокислот

Атомы азота попадают в эти пути через глутамат или глутамин. Десять аминокислот образуются всего за одну или несколько стадий из общих метаболитов-предшественников. Биосинтез других аминокислот, например, ароматических, более сложный.

Организмы сильно различаются по способности синтезировать 20 аминокислот, входящих в состав белков. Большинство бактерий и растений умеют синтезировать их все. Млекопитающие могут синтезировать только около половины из 20 аминокислот – главным образом те, которые образуются простыми способами. Это так называемые **заменимые аминокислоты** – они необязательно должны присутствовать в пищевом рационе. **Незаменимые аминокислоты** непременно должны поступать вместе с пищей.

Аланин синтезируется из пирувата путём трансаминирования (аминогруппа переносится с глутамата).

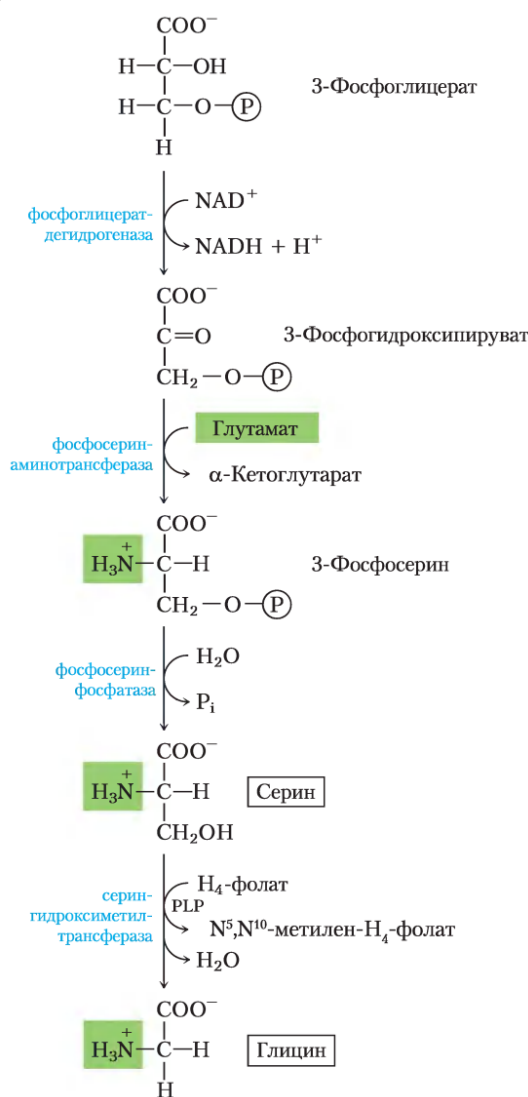


Рис. 14.4. Биосинтез серина

Серин имеет одинаковый основной путь биосинтеза у всех организмов. На первой стадии гидроксильная группа 3-фосфоглицерата окисляется дегидрогеназой (использующей NAD^+) с образованием 3-фосфогидроксипирувата. Путем трансаминирования (перенос аминогруппы с глутамата) образуется 3-фосфосерин, который гидролизуется до свободного серина фосфосеринфосфатазой (рис. 14.4).

Глицин (два атома углерода) образуется из серина (три атома углерода) путём удаления одного атома углерода серингидроксиметилтрансферазой (рис. 14.4). Тетрагидрофолат принимает β -углерод (C-3), который «строит» метиленовый мостик между N-5 и N-10. В результате получается N^5, N^{10} -метилентетрагидрофолат. Суммарная реакция обратима и для неё требуется пиридоксальфосфат.

Тирозин у животных синтезируется непосредственно из фенилаланина гидроксилированием атома C-4 фенильной группы с помощью фермента фенилаланингидроксилазы. Она также участвует в деградации фенилаланина. Тирозин считается условно незаменимой аминокислотой, так как может быть синтезирован из незаменимой аминокислоты фенилаланина.

Глутамат получается восстановительным аминированием α -кетоглутарата.

Аспартат синтезируется из оксалоацетата путём трансаминирования.

Глутамин синтезируется под действием глутаминсинтетазы из глутамата в две стадии с затратой энергии АТФ (рис. 12.6).

Аспарагин получается путём амидирования аспартата с помощью фермента аспарагинсинтетаза. Группу NH_4^+ предоставляет глутамин. Ещё один способ: под действием фермента трансамидаза аспартат и глутамин вступают в реакцию, образуя аспарагин и глутамат.

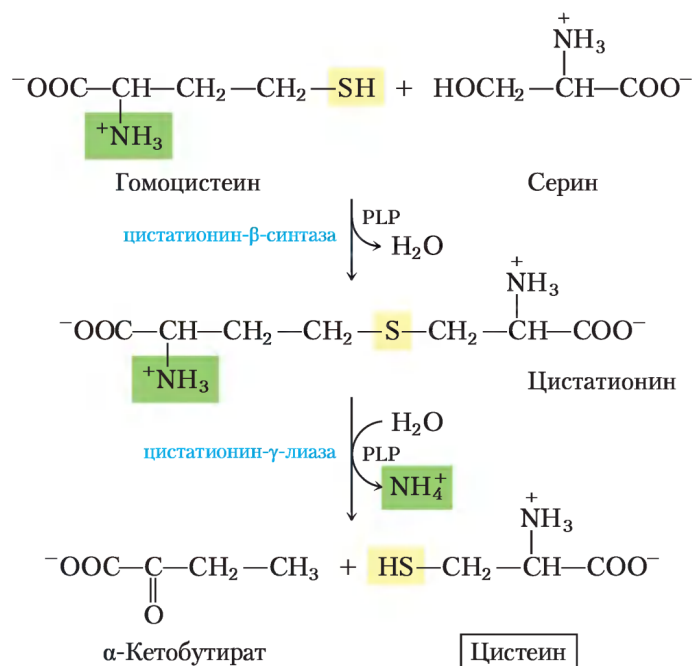


Рис. 14.5. Биосинтез цистеина из гомоцистеина и серина у млекопитающих.

Цистеин синтезируется у млекопитающих из двух аминокислот: метионин предоставляет атом серы, а серин – углеродный скелет. Метионин сначала превращается в S-аденозилметионин (рис. 13.4), который может отдать свою метильную группу любому из акцепторов и превратиться в S-аденозилгомоцистеин (AdoHcy). Этот деметилированный продукт гидролизуется до свободного гомоцистеина, который вступает в реакцию с серином, катализируемую цистатионин-β-синтазой, образуя цистатионин (рис. 14.5). И, наконец, цистатионин-γ-лиаза, фермент, использующий PLP, катализирует удаление аммония и расщепление цистатионина с образованием цистеина.

Пролин – это циклическое производное глутаминовой кислоты (рис. 14.6). На первой стадии синтеза пролина АТФ реагирует с γ-карбоксильной группой глутамата, образуется ацилфосфат, который восстанавливается NAD(P)H до γ-полуальдегида глутамата. Этот промежуточный продукт претерпевает быструю спонтанную циклизацию и последующее восстановление – образуется пролин.

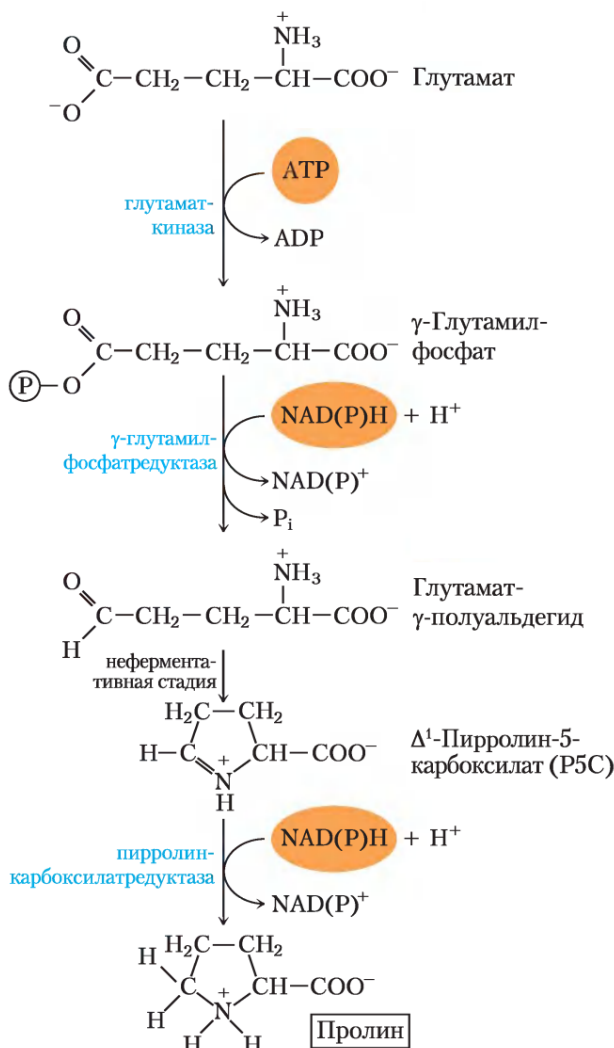


Рис. 14.6 Биосинтез пролина из глутамата

Аргинин у животных синтезируется из глутамата через орнитин в цикле мочевины. Орнитин также может быть синтезирован через трансаминирование γ -полуальдегида глутамата, но из-за спонтанной циклизации последнего, которая приводит к пролину, такая реакция не вносит заметного вклада в синтез орнитина.

У бактерий есть путь синтеза орнитина (и аргинина) *de novo*, некоторые стадии которого совпадают с реакциями, приводящими к пролину, благодаря двум дополнительным стадиям. Проблему спонтанной циклизации γ -полуальдегида глутамата здесь удаётся решить (рис. 14.7). На первой стадии α -аминогруппа глутамата защищается ацелированием при участии ацетил-СоА. После стадии трансаминирования ацетильная группа удаляется с образованием орнитина.

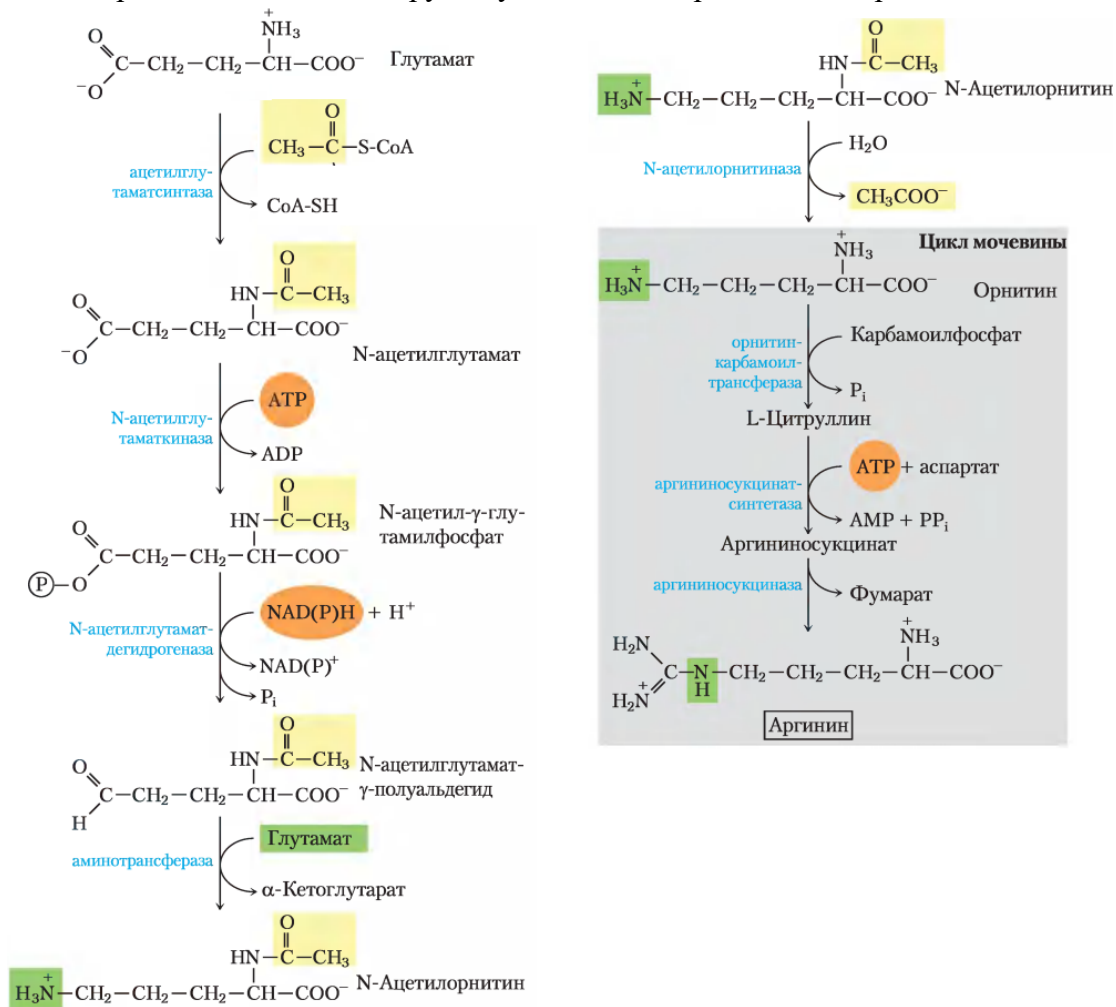


Рис. 14.7. Биосинтез аргинина из глутамата у бактерий

Путь синтеза аргинина, показанный на рис. 14.7, у млекопитающих отсутствует. Когда аргинина, поступающего с пищей или при превращениях собственных белков, недостаточно, осуществляемая орнитин- δ -аминотрансферазой реакция протекает в направлении образования орнитина. Затем орнитин превращается в цитруллин и аргинин в цикле мочевины.

Лекция 15. Глюконеогенез

Гликолиз и глюконеогенез. Общие стадии

Глюкоза является практически универсальным источником энергии и строительным блоком. Некоторые ткани млекопитающих получают всю необходимую энергию только из неё. Глюкозы, запасённой в форме гликогена в мышцах и печени, не всегда хватает. Гликоген расходуется между приёмами пищи, при длительном голодании и после интенсивной физической нагрузки. В такие периоды организм должен синтезировать глюкозу из предшественников неуглеводной природы. Этот синтез осуществляется с помощью метаболического пути, называемого глюконеогенезом («новое» образование сахаров), в котором пируват и другие соединения, состоящие из трёх или четырёх атомов углерода, превращаются в глюкозу.

Механизм этого процесса примерно одинаков во всех клетках и во всех организмах. У млекопитающих глюконеогенез протекает преимущественно в печени и в меньшей степени в корковом веществе почек, в то время как гликолиз идёт во всех возможных тканях. Синтезированная глюкоза поступает в кровь для снабжения других тканей. Лактат, образующийся в мышцах в результате анаэробного гликолиза при тяжёлой физической нагрузке, снова поступает в печень и превращается в глюкозу, которую кровь переносит обратно в мышцы, где из нее образуется гликоген. Данный цикл называют циклом Кори.

Метаболические пути гликолиза и глюконеогенеза не идентичны. Они протекают в противоположных направлениях, хотя на самом деле имеют несколько общих стадий (рис. 15.1). 7 из 10 ферментативных реакций глюконеогенеза – это обратные реакции гликолиза. Три реакции гликолиза *in vivo* необратимы и не могут использоваться в глюконеогенезе: превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат под действием гексокиназы, фосфорилирование фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-бисфосфата под действием фосфофруктокиназы-1 и превращение фосфоенолпирувата в пируват при участии пируваткиназы (рис. 15.1). В клетках эти реакции характеризуются большим отрицательным изменением стандартной свободной энергии, в то время как другие реакции гликолиза имеют ΔG , близкое к нулю. В глюконеогенезе три необратимые стадии осуществляются другим набором ферментов, которые катализируют экзергонические реакции ($\Delta G \ll 0$), протекающие необратимо в сторону образования глюкозы.

Таким образом, в клетках как гликолиз, так и глюконеогенез протекают необратимо. У животных оба пути осуществляются в основном в цитозоле, что требует их координированной регуляции. Независимая регуляция двух метаболических путей осуществляется через те ферментативные стадии, которые не являются для них общими.

Первый обходной путь – превращение пирувата в фосфоенолпируват

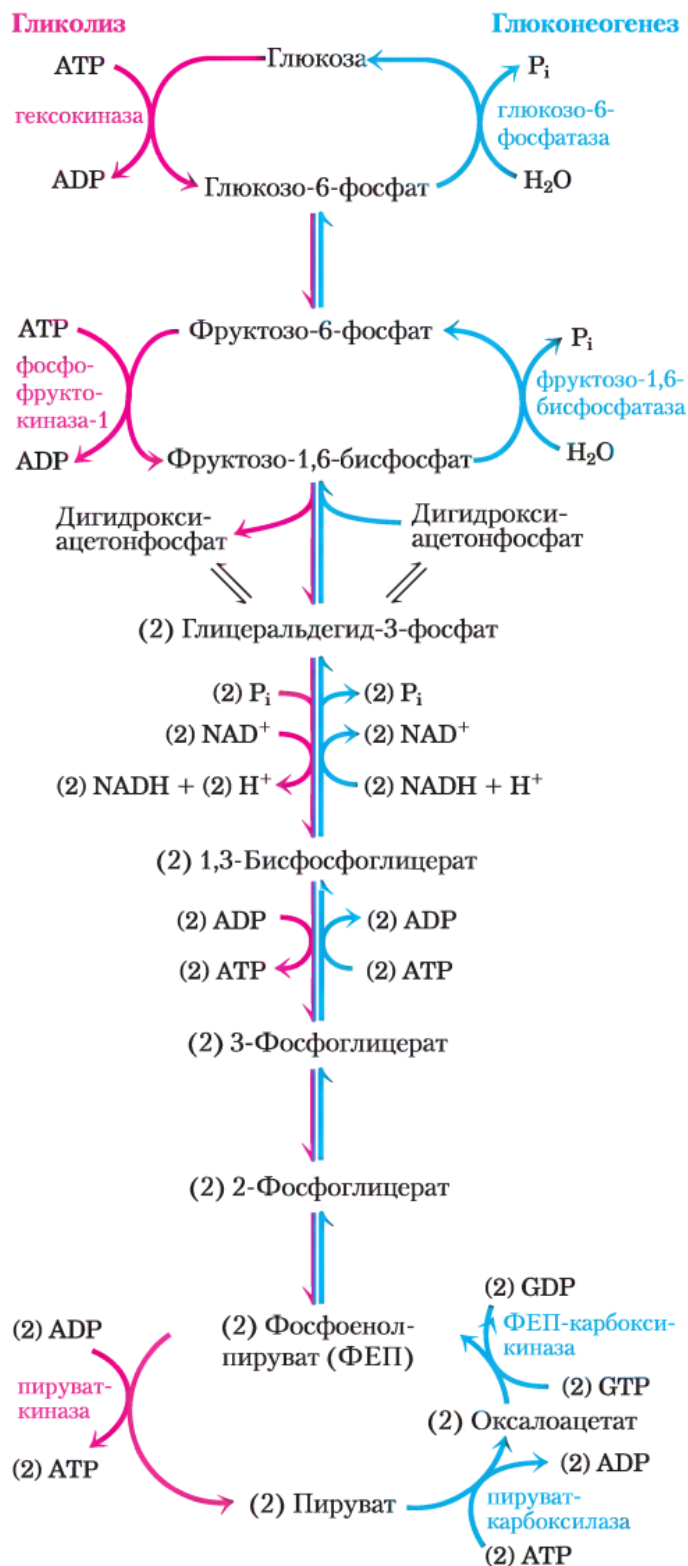


Рис. 15.1. Противоположно направленные пути гликолиза и глюконеогенеза

Первая обходная реакция глюконеогенеза – это превращение пирувата в фосфоенолпируват (ФЕП). Данный процесс не может осуществляться простым обращением пируваткиназной реакции гликолиза, которая характеризуется большим отрицательным значением изменения стандартной свободной энергии и поэтому в интактной клетке необратима. Вместо этого фосфорилирование пирувата реализуется по обходному пути, состоящему из последовательности реакций, которые в эукариотических клетках требуют участия как цитозольных, так и митохондриальных ферментов.

Этот путь превращения пирувата в ФЕП является основным, если предшественником для образования глюкозы служит пируват или аланин. Второй путь, описанный ниже, преобладает в том случае, когда предшественником глюкозы служит лактат.

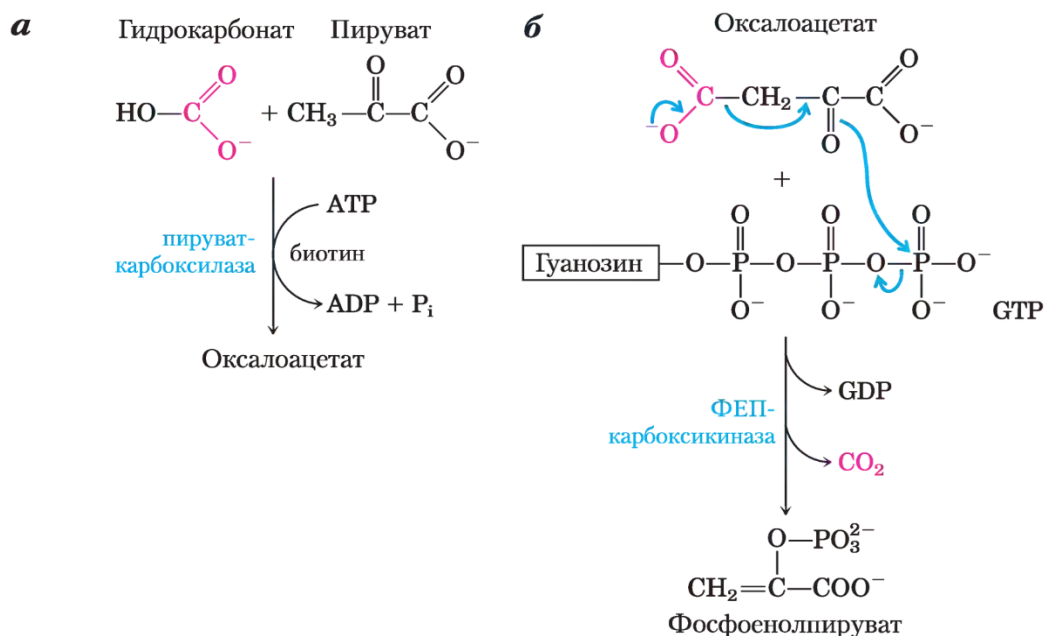
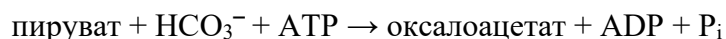
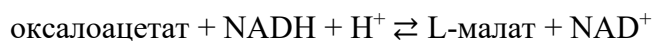


Рис. 15.2. Синтез фосфоенолпирувата из пирувата

Прежде всего пируват транспортируется из цитозоля в митохондрии или образуется в митохондриях из аланина в процессе трансаминирования, при котором α-аминогруппа аланина удаляется (в результате чего образуется пируват) и переносится на α-кетокислоту. Затем митохондриальный фермент пируваткарбоксилаза в присутствии кофермента биотина превращает пируват в оксалоацетат (рис. 15.2, а):



Митохондриальная мембрана не содержит переносчиков оксалоацетата, поэтому до переноса в цитозоль оксалоацетат, образовавшийся из пирувата, переходит в восстановленную форму (малат – соль молочной кислоты) под действием митохондриального фермента малатдегидрогеназы, используя NADH:

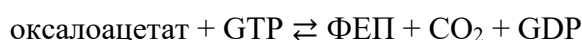


В этой реакции изменение стандартной свободной энергии довольно значительное, но в физиологических условиях (в том числе при очень низкой концентрации оксалоацетата) $\Delta G \approx 0$, и реакция легко протекает в обратном направлении.

Малат покидает митохондрии с помощью специальной транспортной системы, находящейся во внутренней митохондриальной мембране (рис. 6.6). В цитозоле малат вновь окисляется до оксалоацетата с образованием NADH:



Затем оксалоацетат под действием фосфоенолпируваткарбоксикиназы превращается в ФЕП (рис. 15.2, б). Эта реакция требует присутствия GTP в качестве донора фосфорильной группы:



Во внутриклеточных условиях реакция обратима. Образование одного богатого энергией фосфата (ФЕП) уравнивается гидролизом другого фосфата (GTP).

Суммарное уравнение этого обходного метаболического пути:



Итак, для превращения одной молекулы пирувата в ФЕП должны израсходоваться две высокоэнергетические фосфатные группы (одна от АТФ и одна от GTP), каждая из них при внутриклеточных условиях обладает энергией -50 кДж/моль. Напротив, при превращении ФЕП в пируват в процессе гликолиза лишь одна молекула АТФ синтезируется из АДФ. Хотя изменение стандартной свободной энергии $\Delta G'^{\circ}$ двухстадийного превращения пирувата в ФЕП составляет 0,9 кДж/моль, истинное изменение свободной энергии с учетом внутриклеточных концентраций интермедиатов имеет довольно большое отрицательное значение (-25 кДж/моль). Это связано с тем, что образующийся ФЕП быстро расходуется в других реакциях, так что его концентрация постоянно находится на достаточно низком уровне. Таким образом, внутри клетки данная реакция практически необратима.

Важно, что в реакции, катализируемой ФЕП-карбоксикиназой, высвобождается та же самая молекула CO_2 , что присоединяется к пирувату на стадии, катализируемой пируваткарбоксилазой (рис. 15.2, б). Эта последовательность реакций карбоксилирования-декарбоксилирования служит для «активации» пирувата, поскольку декарбоксилирование оксалоацетата облегчает образование ФЕП.

Эти реакции происходят в митохондриях, поскольку отношение NADH/NAD^+ в цитозоле примерно в 10^5 раз ниже, чем в митохондриях. Поскольку NADH из цитозоля расходуется в процессе глюконеогенеза для превращения 1,3-бисфосфоглицерата в глицеральдегид-3-фосфат (рис. 15.1), без достаточного количества NADH биосинтез глюкозы происходить не может. Транспортировка малата из митохондрий в цитозоль и его превращение в оксалоацетат способствует переносу восстановительных эквивалентов в цитозоль, где наблюдается их дефицит. Таким образом, превращение

пирувата в ФЕП обеспечивает важный баланс в процессе глюконеогенеза между произведённым и израсходованным в цитозоле NADH.

Второй вариант первого обходного пути (через лактат)

Второй вариант обходной реакции от пирувата к ФЕП преобладает в тех случаях, когда исходным веществом для синтеза глюкозы служит лактат (рис. 15.3). Такой метаболический путь использует лактат, образовавшийся при гликолизе, например, в эритроцитах или в анаэробных условиях в мышцах, и он играет особенно важную роль у крупных позвоночных в период после интенсивной физической нагрузки. Превращение лактата в пируват в цитозоле гепатоцитов сопровождается образованием NADH, поэтому в данном случае нет нужды в переносе восстановительных эквивалентов (в форме малата) из митохондрий.

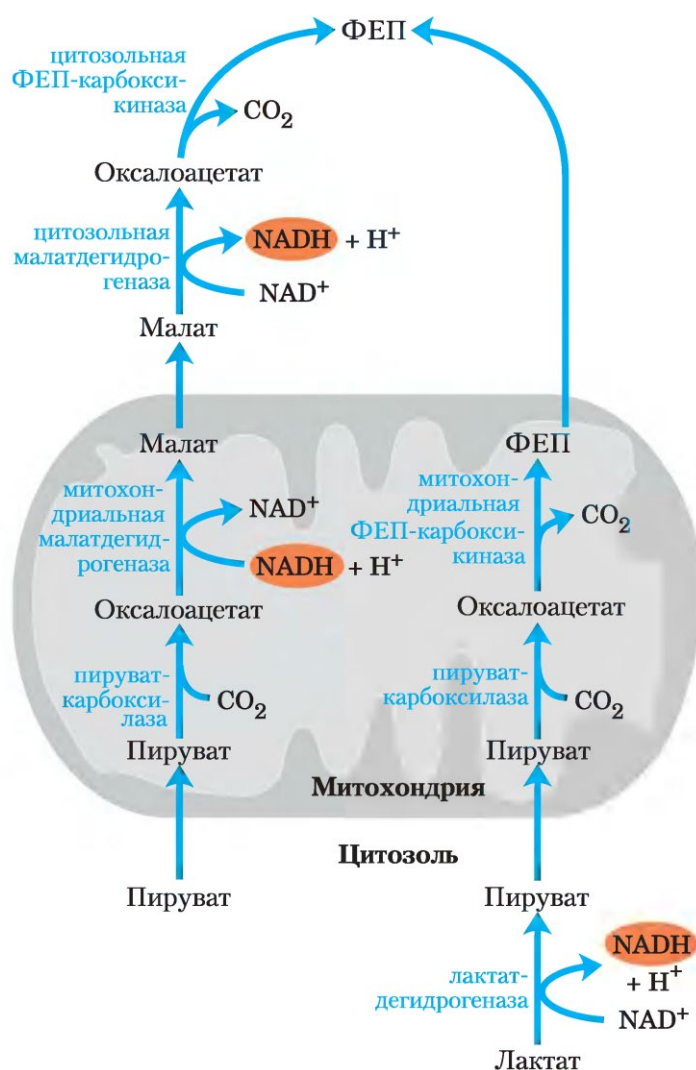


Рис. 15.3. Альтернативные пути образования фосфоенолпирувата (ФЕП) из пирувата

Пируват, образовавшийся в лактатдегидрогеназной реакции, переносится в митохондрии и превращается в оксалоацетат под действием пируваткарбоксилазы, как описано выше. Однако этот оксалоацетат под действием митохондриального изофермента ФЕП-карбоксикиназы превращается сразу в ФЕП, а ФЕП выносится из митохондрий для продолжения глюконеогенеза. Митохондриальный и цитозольный изоферменты ФЕП-карбоксикиназы кодируются разными хромосомными генами, что служит еще одним примером того, как два различных фермента, катализирующих одну и ту же реакцию, локализованы в разных частях клетки или имеют разные метаболические функции.

Вклад каждого из двух процессов определяется доступностью лактата или пирувата, а также потребностью в NADH в цитозоле для глюконеогенеза.

Второй обходной путь – превращение фруктозо-1,6-бисфосфата во фруктозо-6-фосфат

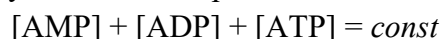
Ещё одной реакцией гликолиза, которая не может использоваться для глюконеогенеза, является фосфорилирование фруктозо-6-фосфата под действием фосфофруктокиназы-1. Эта реакция характеризуется большим отрицательным значением изменения стандартной свободной энергии и, следовательно, необратима в условиях клетки, поэтому образование фруктозо-6-фосфата из фруктозо-1,6-бисфосфата (рис. 15.1) осуществляется под действием другого фермента – фруктозо-1,6-бисфосфатазы (ФБФаза-1). При этом происходит практически необратимый гидролиз фосфатной группы у атома С-1 (а не перенос фосфорильной группы на ADP):
фруктозо-1,6-бисфосфат + H₂O → фруктозо-6-фосфат + P_i ΔG^o = -16,3 кДж/моль

Итак, фосфофруктокиназа-1 катализирует фосфорилирование фруктозо-6-фосфата за счет АТФ, а в глюконеогенезе ей соответствует фруктозо-1,6-бисфосфатаза, катализирующая обходную реакцию – гидролиз фруктозо-1,6-дифосфата, в результате которого и образуется фруктозо-6-фосфат. Суммируя эти два противоположно направленных процесса, мы получаем реакцию, в которой энергия расходуется впустую, потому что суммарный гидролиз АТФ не сопровождается в этом случае никакой реальной метаболической работой. Ясно, что если две указанные реакции будут одновременно и с большой скоростью идти в одной и той же клетке, то это может привести к большим потерям энергии – она будет рассеиваться в виде тепла. Такой цикл, результатом которого является распад АТФ, получил название «**холостой**» **цикл**.

В нормальных условиях холостые циклы, вероятно, не имеют места, так как их появлению препятствуют реципрокные регуляторные механизмы. Всякий раз, когда преобладает катаболизм, то есть когда суммарный поток направлен в сторону гликолиза, фруктозо-1,6-бисфосфатазная активность выключается. И наоборот, когда суммарный поток направлен в сторону глюконеогенеза, выключается фосфофруктокиназа-1.

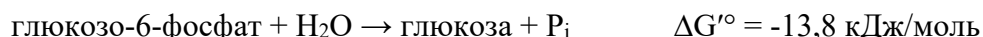
Однако иногда холостые циклы могут происходить и в физиологических условиях, имея при этом вполне определённый биологический смысл – производство тепла. Любопытный пример подобного холостого цикла обнаружен у некоторых насекомых. В холодную погоду шмель не может летать до тех пор, пока он не прогреет свой «мотор». Температура мышц должна подняться у него примерно до 30 °С и поддерживаться на этом уровне за счёт холостого цикла с участием фруктозо-6-фосфата и фруктозо-1,6-бисфосфата и последующим гидролизом АТФ, который служит источником тепла. Полагают также, что холостые циклы, генерирующие тепло, имеют место и у некоторых животных, пробуждающихся после зимней спячки, то есть в период, когда температура тела животного бывает гораздо ниже нормы.

Гликолиз и глюконеогенез – процессы, которые должны регулироваться независимо, но согласованно. Независимость реализуется за счет включенности разных ферментов в эти процессы. Согласованность достигается за счёт разных эффекторов, но из одного пула. Например, данную реакцию в направлении гликолиза стимулирует АМР и АДФ, а блоком для неё являются АТФ и цитрат. Это активаторы и ингибиторы фосфофруктокиназы. А для смежной реакции (в направлении глюконеогенеза) мощным ингибитором фруктозо-1,6-бисфосфатазы является АМФ, а активатором – АТФ. Такая регуляция называется взаимосогласованной (реципрокной). То есть общая концентрация адениновых нуклеотидов в организме постоянна:



Третий обходной путь – образование глюкозы из глюкозо-6-фосфата

Этот обходной путь реализуется на заключительной стадии глюконеогенеза и представляет собой дефосфорилирование глюкозо-6-фосфата с образованием глюкозы (рис. 15.1). Обращение гексокиназной реакции требовало бы переноса фосфатной группы от глюкозо-6-фосфата на АДФ с образованием АТФ, что энергетически невыгодно. Реакция, катализируемая глюкозо-6-фосфатазой, не сопровождается синтезом АТФ, это просто гидролиз эфира фосфорной кислоты:



Этот фермент обнаруживается на люменальной поверхности эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, клеток почек и эпителиальных клеток тонкой кишки, но не других тканей, которые, следовательно, не могут поставлять глюкозу в кровь. Если бы другие ткани содержали глюкозо-6-фосфат, данная ферментативная активность позволяла бы гидролизовать глюкозо-6-фосфат, необходимый этим тканям для гликолиза. Глюкоза, образующаяся в результате глюконеогенеза в печени или почках, а также потребляемая с пищей, доставляется в мозг и в мышечные ткани кровотоком.

Метаболизм гликогена

Гликоген – запасной полисахарид животных. Это разветвлённый гомополимер глюкозы (рис. 3.3), в котором остатки глюкозы соединены $\alpha(1\rightarrow4)$ -гликозидной связью. Связи в точках ветвления находятся в положении $\alpha(1\rightarrow6)$ примерно каждого 10-го остатка. Гликоген обращён наружу нередуцирующим концом (то есть четвёртым атомом углерода), редуцирующие концы заняты на образование связи. Иначе гликоген был бы слишком реакционно способным, и в итоге запас не получалось бы сохранить.

У позвоночных гликоген откладывается главным образом в печени и в мышцах. Гликоген мышц используется в качестве доступного источника энергии как для аэробного, так и для анаэробного метаболизма. При активной физической нагрузке его запасы могут быть исчерпаны менее чем за час. Гликоген из печени служит источником глюкозы для других тканей в тех случаях, когда глюкоза не поступает с пищей (между приёмами пищи или в период голодания). Это особенно важно для нейронов головного мозга, которые не могут использовать в качестве источника энергии жирные кислоты. Запасы гликогена в печени могут быть исчерпаны за 12-24 ч.

В мышцах и печени механизмы накопления и использования гликогена общие, но у тканеспецифичных ферментов несколько различаются, что связано с разной ролью гликогена в этих двух тканях. Гликоген, кроме того, поступает в организм с пищей и расщепляется в кишечнике. В этом процессе участвует другой набор гидролитических ферментов, превращающих гликоген в глюкозу.

В мышцах и печени глюкозные звенья из внешних ветвей гликогена вовлекаются в гликолиз в результате действия трёх ферментов: гликогенфосфорилазы (фермента, расщепляющего цепи в участках ветвления) и фосфоглюкомутазы.

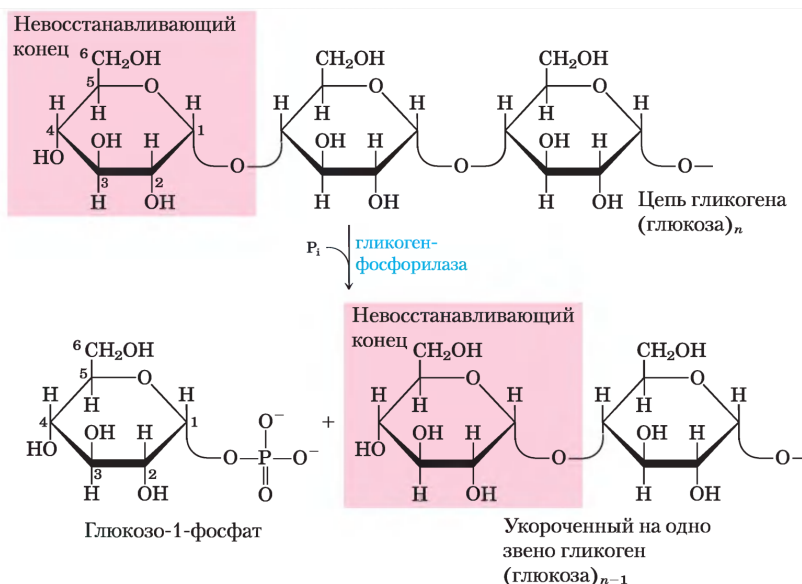
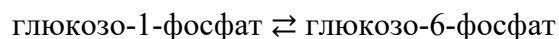


Рис. 15.4. Реакция, катализируемая гликогенфосфорилазой

Гликогенфосфорилаза катализирует атаку неорганического фосфата P_i на $(\alpha 1 \rightarrow 4)$ -гликозидную связь между двумя остатками глюкозы на невосстанавливаемом конце гликогена, в результате чего концевой остаток глюкозы отщепляется в виде α -D-глюкозо-1-фосфата (рис. 15.4).

Конечный продукт реакции с участием гликогенфосфорилазы глюкозо-1-фосфат под действием фосфоглюкомутазы превращается в глюкозо-6-фосфат:



В начале реакции фермент фосфорилирован по остатку Ser (рис. 15.5). На стадии ① фермент передаёт свою фосфорильную группу (выделена зеленым цветом) глюкозо-1-фосфату, в результате чего образуется глюкозо-1,6- бисфосфат. На стадии ② фосфорильная группа из положения C-1 глюкозо-1,6-бисфосфата (выделена красным цветом) переносится обратно на фермент, что приводит к регенерации фосфорилированного фермента и образованию глюкозо-6-фосфата.

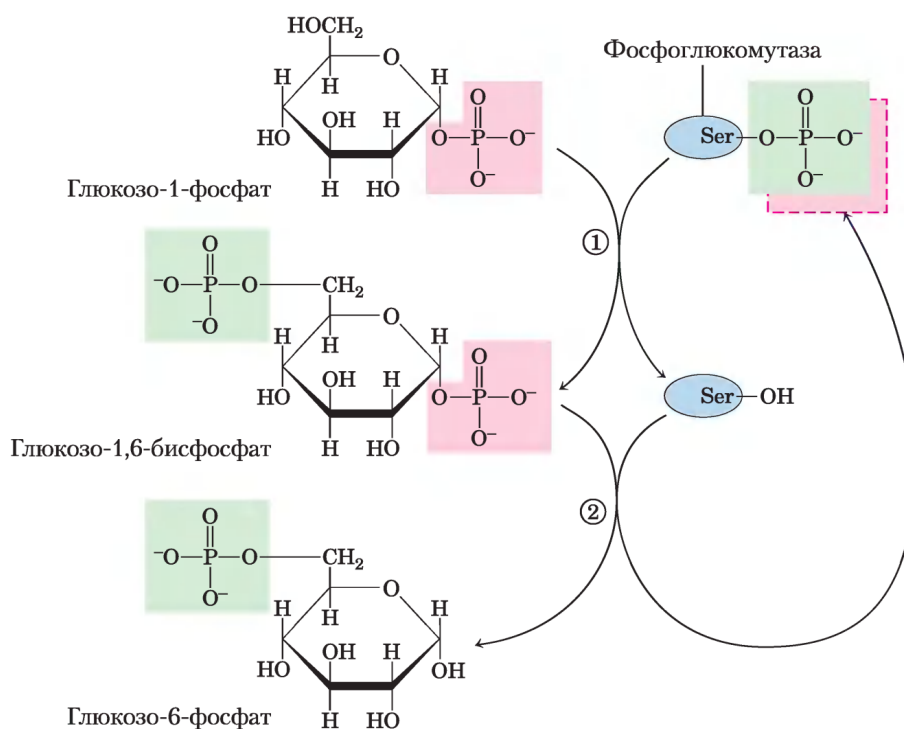
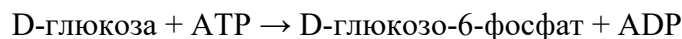


Рис. 15.5. Реакция, катализируемая фосфоглюкомутазой

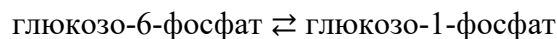
Образующийся из гликогена в мышцах глюкозо-6-фосфат может вовлекаться в гликолиз и служить источником энергии для обеспечения мышечного сокращения. В печени разложение гликогена преследует другую цель: поддерживать уровень глюкозы крови, например, между приемами пищи. В этом процессе задействована глюкозо-6-фосфатаза, обнаруженная только в тканях печени и почек. Поскольку в мышцах и в жировой ткани глюкозо-6-фосфатаза отсутствует, эти ткани не могут превращать глюкозо-6-фосфат, образовавшийся при распаде гликогена, в глюкозу. Таким образом, эти ткани не вносят никакого вклада в поддержание уровня глюкозы крови.

Синтез гликогена происходит практически во всех тканях организма, но особенно интенсивно в печени и скелетных мышцах. Отправной точкой для синтеза служит глюкозо-6-фосфат. Это соединение может образоваться из свободной глюкозы под действием изоферментов – гексокиназы I и гексокиназы II в мышцах или гексокиназы IV (глюкокиназы) в печени:



Однако некоторая часть глюкозы, попадающей в организм с пищей, вовлекается в гликолиз более сложным путем. Она сначала захватывается эритроцитами и в процессе гликолиза превращается в лактат, затем лактат попадает в печень и в результате глюконеогенеза превращается там в глюкозо-6-фосфат.

На первом этапе синтеза гликогена глюкозо-6-фосфат превращается в глюкозо-1-фосфат под действием фосфоглюкомутазы:



Ключевым моментом в синтезе гликогена является превращение продукта реакции в UDP-глюкозу с помощью фермента UDP-глюкозопирофосфорилазы:



Название данного фермента связано с обратной реакцией. В клетке реакция протекает в сторону образования UDP-глюкозы, поскольку выделяющийся пирофосфат быстро гидролизуется под действием неорганической пирофосфатазы.

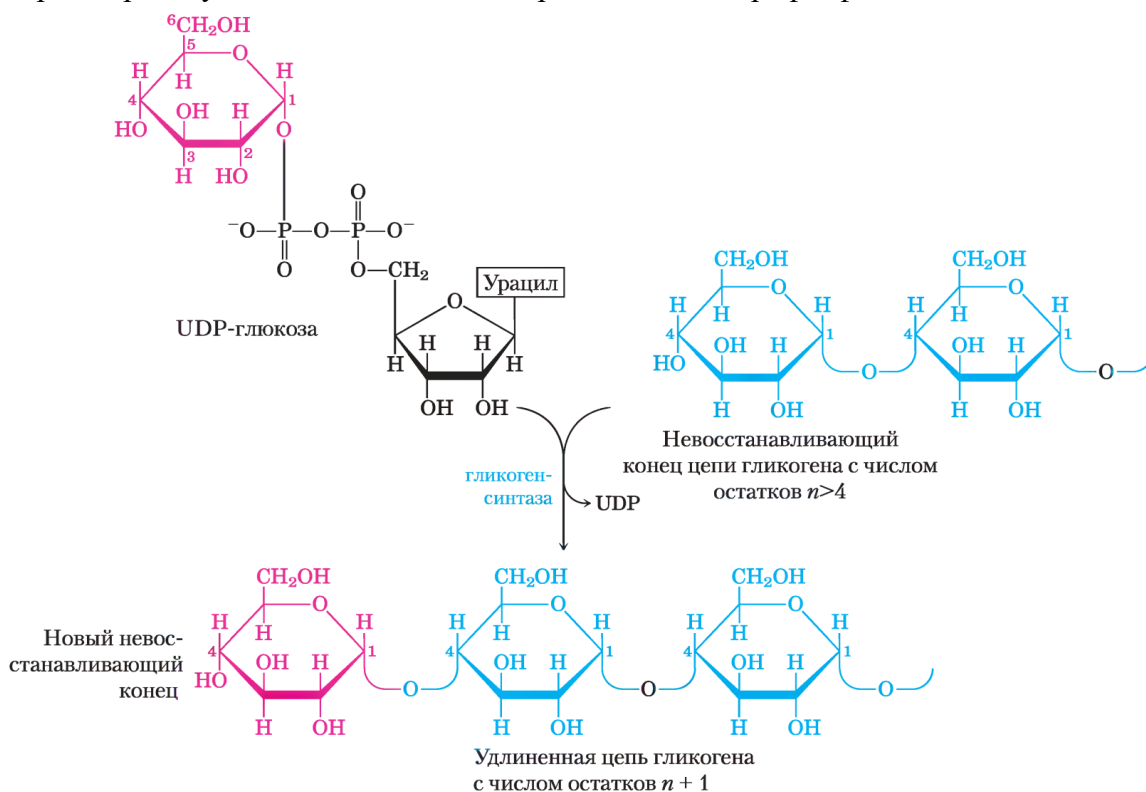


Рис. 15.6. Синтез гликогена. Удлинение цепи под действием гликогенсинтазы

UDP-глюкоза выступает в качестве прямого донора остатков глюкозы в реакции, катализируемой гликогенсинтазой (рис. 15.6), которая способствует переносу остатка глюкозы от UDP-глюкозы на невосстанавливающий конец разветвлённой молекулы гликогена. Общее равновесие при встраивании глюкозо-6-фосфата в растущую цепь гликогена сильно сдвинуто в сторону синтеза.

Согласованная регуляция синтеза и распада гликогена

Существуют две взаимопревращающиеся формы мышечной гликогенфосфорилазы: каталитически активная гликогенфосфорилаза а и менее активная гликогенфосфорилаза б (рис. 15.7). Исследования показали, что в мышцах в состоянии покоя преобладает фосфорилаза б, а при активной мышечной деятельности гормон адреналин даёт команду фосфорилирования специфического остатка Ser в молекуле фосфорилазы б, в результате чего она превращается в более активную фосфорилазу а.

Действие адреналина приводит к активации GTP-связывающего белка, который способствует повышению концентрации сАМР, тем самым активируя протеинкиназу А (РКА). Данные события вызывают серию реакций фосфорилирования, РКА активирует киназу фосфорилазы б, которая затем активирует гликогенфосфорилазу. Подобный каскадный механизм приводит к значительному усилению исходного сигнала.

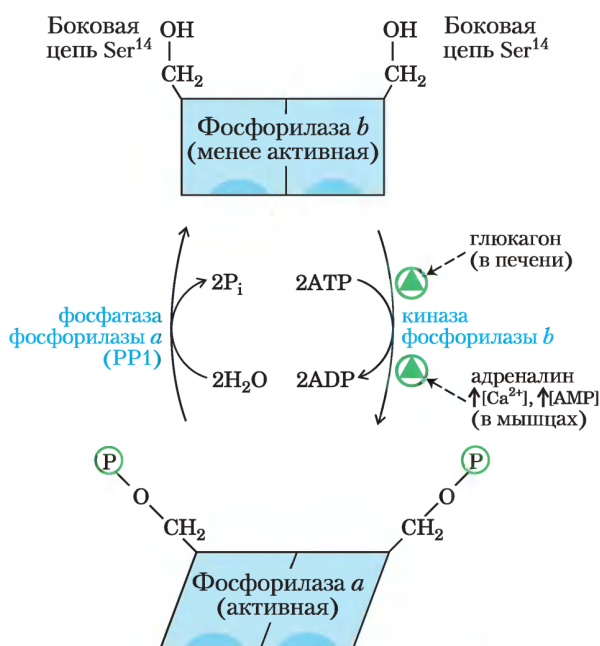


Рис. 15.7. Регуляция гликогенфосфорилазы путём ковалентной модификации

Фосфорилаза а превращается в менее активную фосфорилазу б в результате ферментативного отщепления фосфорильных групп, катализируемого фосфатазой фосфорилазы а (PP1). Фосфорилаза б может вновь превратиться в активную фосфорилазу а под действием киназы фосфорилазы б.

Подобно гликогенфосфорилазе, гликогенсинтаза может существовать в фосфорилированной и дефосфорилированной формах (рис. 15.8). Активная форма этого фермента – гликогенсинтаза а – не фосфорилирована. Фосфорилирование гидроксильных групп некоторых остатков Ser в обеих субъединицах фермента превращает гликогенсинтазу а в гликогенсинтазу b, которая проявляет активность только в присутствии своего аллостерического активатора глюкозо-6-фосфата.

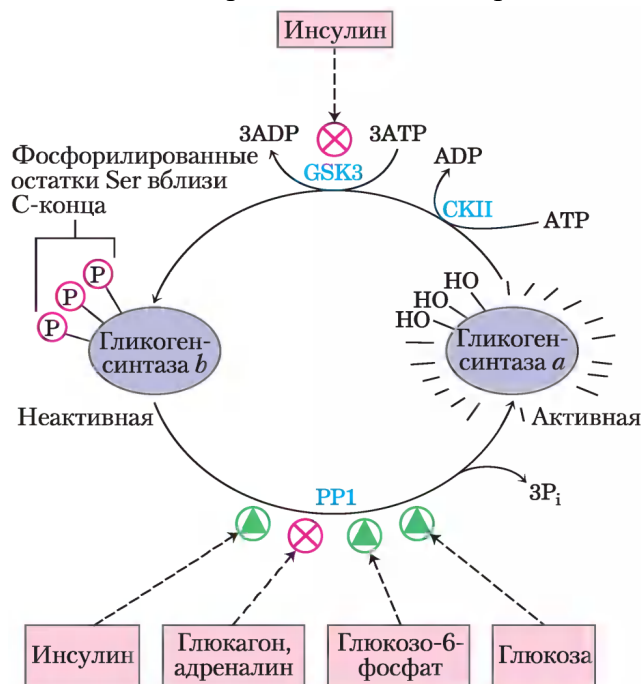


Рис. 15.8. Регуляция гликогенсинтазы

Синтез гликогена *de novo*

Гликогенсинтаза не может инициировать синтез цепи гликогена *de novo*. Для этого необходим праймер (затравка), в качестве которого обычно выступает фрагмент цепи, по меньшей мере, из восьми остатков глюкозы, связанных ($\alpha 1 \rightarrow 4$)-связью. Белок гликогенин является одновременно и праймером, на котором происходит сборка новой цепи, и ферментом, катализирующим процесс сборки.

Первый шаг на пути синтеза новой молекулы гликогена состоит в переносе остатка глюкозы от UDP-глюкозы на специфический остаток Туг гликогенина под действием глюкозилтрансферазной активности фермента (рис. 15.9). Зарождающаяся цепь удлиняется путем присоединения ещё семи остатков глюкозы, каждый из которых поступает от UDP-глюкозы. Катализатором этих реакций вновь выступает гликогенин. Далее к процессу подключается гликогенсинтаза, удлиняющая цепь гликогена. Будучи ковалентно связанным с одним восстанавливающим концом молекулы гликогена, гликогенин остается внутри образующейся гранулы гликогена (рис. 15.9, б).

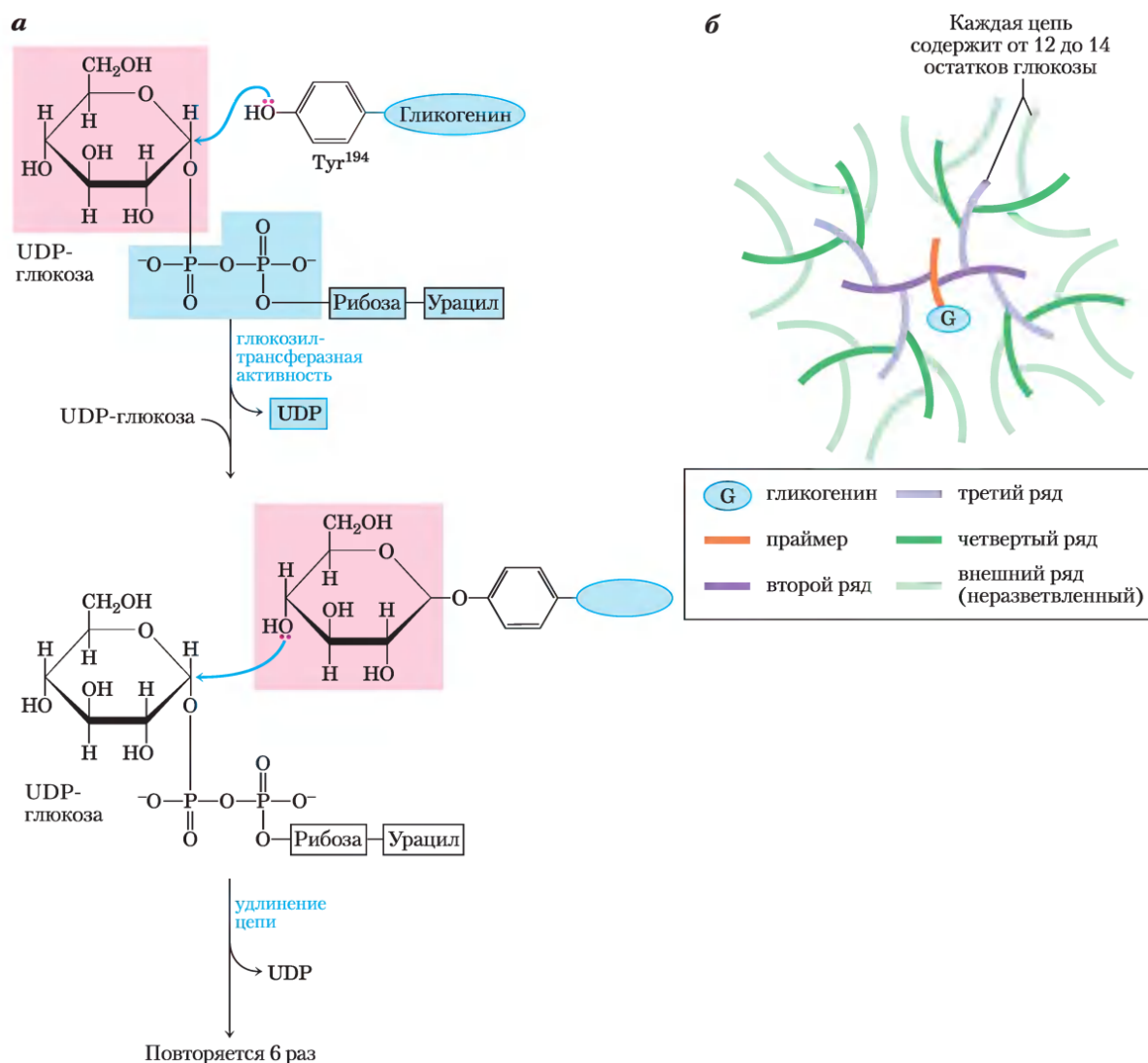


Рис. 15.9. Гликогенин и строение частицы гликогена

Гликогенсинтаза не может формировать $(\alpha 1 \rightarrow 6)$ -связи, находящиеся в точках ветвления молекул гликогена. Эти связи создаёт специальный фермент ветвления гликогена – 1,4 \rightarrow 1,6-трансгликозидаза (гликозил-4,6-трансфераза). Данный фермент катализирует перенос концевой участка из 6-7 остатков глюкозы от невосстанавливающего конца цепи гликогена, состоящего не менее чем из 11 остатков, на OH-группу атома C-6 остатка глюкозы, расположенного ближе к началу той же или другой цепи гликогена, создавая тем самым новую ветвь (рис. 15.10). Дальнейшее удлинение этого фрагмента осуществляет гликогенсинтаза. Биологический «смысл» синтеза разветвлённого полимера состоит в улучшении его растворимости и создании максимального количества невосстанавливающих концов. Тем самым достигается увеличение числа участков, доступных для гликогенфосфорилазы и гликогенсинтазы, поскольку оба фермента действуют только на невосстанавливающие концы цепи.

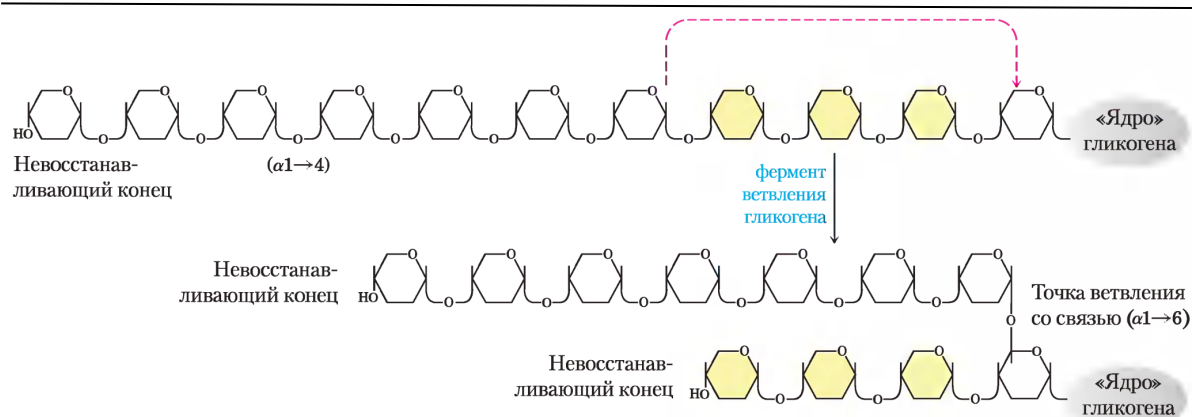


Рис. 15.10. Образование разветвлений в цепи гликогена

Два типа гексокиназы

Различие между гексокиназами печени и мышц отражает разные функции этих органов в метаболизме углеводов: мышцы потребляют глюкозу, используя её для получения энергии, в то время как печень поддерживает гомеостаз глюкозы в крови путем удаления или синтеза глюкозы в зависимости от её текущей концентрации. В печени преобладает гексокиназа IV (глюкокиназа), которая отличается от мышечных гексокиназ I — III по следующим параметрам:

гексокиназа I-III	гексокиназа IV (глюкокиназа)
ингибируется Glc-6-P	не ингибируется Glc-6-P
многие ткани	печень
субстрат – многие гексозы	субстрат – только Glc
$K_m = 0,1 \text{ mM}$	$K_m = 10 \text{ mM}$
конечные продукты: CO_2 , H_2O , АТФ	конечные продукты: гликоген

При высокой концентрации глюкозы в крови после употребления богатой углеводами пищи избыточная глюкоза переносится в гепатоциты, где гексокиназа IV превращает её в глюкозо-6-фосфат. При низкой концентрации глюкозы в крови образующаяся в ходе глюконеогенеза глюкоза выходит из клетки до того, как подвергается фосфорилированию.

При голодании фруктозо-6-фосфат вызывает ингибирование гексокиназы IV с помощью регуляторного белка, так что печень не конкурирует за глюкозу с другими органами. Этот белок, локализованный в ядре, связывает гексокиназу IV, благодаря чему она оказывается отделённой от других ферментов гликолиза, находящихся в цитозоле. При повышении концентрации глюкозы в клетке этот фермент начинает проникать из цитозоля в ядро до тех пор, пока не устанавливается равновесие. Глюкоза вызывает диссоциацию регуляторного белка из комплекса, гексокиназа IV вновь переходит в цитозоль и начинает фосфорилировать глюкозу.

Лекция 16. Фотосинтез. Световая фаза

Круговорот углерода. Автотрофные фотосинтетика

Фотосинтезирующие и гетеротрофные организмы сосуществуют в биосфере в сбалансированном стационарном состоянии (рис. 16.1). Фотосинтезирующие организмы поглощают солнечную энергию и запасают её в форме АТФ и NADPH, которые служат им источником энергии для синтеза углеводов и других органических компонентов клетки из углекислого газа и воды. При этом они выделяют в атмосферу кислород. Аэробные гетеротрофы, например, человек и растения в темноте, используют этот кислород для расщепления богатых энергией продуктов фотосинтеза до CO_2 и H_2O . и за счёт этой энергии синтезируют АТФ для своих собственных нужд. Углекислый газ, образующийся при дыхании гетеротрофов, возвращается в атмосферу и вновь используется фотосинтезирующими организмами.

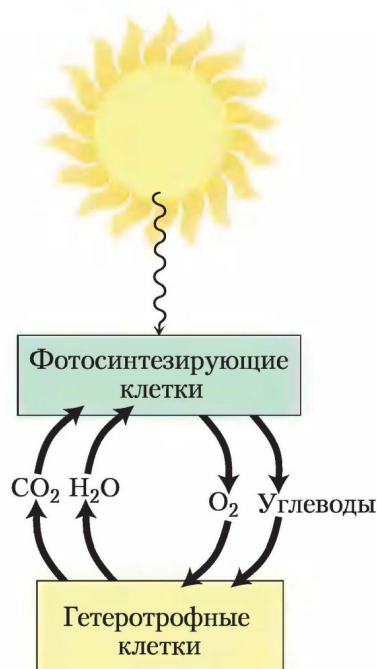


Рис. 16.1. Солнечная энергия – первичный источник всей биологической энергии

Солнечная энергия создаёт движущую силу для круговорота, в процессе которого углекислый газ и кислород атмосферы непрерывно циркулируют, проходя через биосферу и образуя восстановленные субстраты, например глюкозу, которая служит источником энергии для нефотосинтезирующих организмов.

Растения должны быть самыми универсальными живыми системами в метаболизме углеводов по нескольким причинам. Во-первых, как автотрофы растения способны превращать неорганический углерод (такой, как CO_2) в органические соединения. Во-вторых, биосинтез происходит в основном в пластидах – ограниченных мембраной органеллах, свойственных растениям, а передвижение интермедиатов

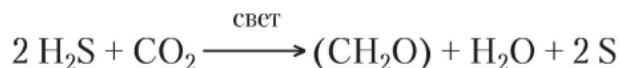
между компартментами клетки – важный аспект метаболизма. В-третьих, растения неподвижны: они не могут передвигаться в поисках более доступной воды, солнечного света или нитратов. Они должны иметь достаточную метаболическую лабильность, которая позволила бы им адаптироваться к изменяющимся условиям того места, где они растут. Наконец, у растений многослойная клеточная стенка состоит из высокомолекулярных углеводов (природных биополимеров). Она должна собираться с наружной стороны плазматической мембраны, причем на неё приходится значительная часть всех углеводов клетки.

Для синтеза углеводов в животной клетке всегда используются предшественники, имеющие хотя бы три атома углерода, которые окислены менее, чем углерод в CO_2 . В отличие от этого, растения и фотосинтезирующие микроорганизмы могут синтезировать углеводы из CO_2 и воды, восстанавливая CO_2 с расходом энергии АТФ и NADPH, получаемых в результате светозависимых реакций фотосинтеза. Растения (и другие автотрофы) могут использовать CO_2 в качестве единственного источника атомов углерода, необходимых для биосинтеза целлюлозы и крахмала, липидов, белков, и многих других органических компонентов растительной клетки. В отличие от них, гетеротрофы не могут осуществлять реакции восстановления CO_2 для синтеза глюкозы.

Для процесса фотосинтеза у растений, когда для восстановления углекислого газа до углеводов в качестве донора электронов (водорода) используется вода, общее уравнение можно записать следующим образом:



Однако фотосинтез происходит не только в хорошо знакомых нам сосудистых растениях. Не менее половины всего фотосинтеза на Земле осуществляется микроорганизмами – водорослями, низшими формами эукариот, а также фотосинтезирующими бактериями. Кроме того, многие фотосинтезирующие бактерии – облигатные анаэробы, то есть вообще не переносят кислорода, а в качестве донора электронов (водорода) вместо воды используют неорганические соединения. Например, у зеленых серных бактерий донором водорода служит сероводород:

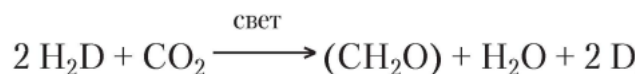


Эти бактерии выделяют вместо молекулярного кислорода элементную серу – продукт окисления H_2S . Сера затем окисляется до SO_4^{2-} . Другие фотосинтезирующие бактерии используют в качестве донора электронов (водорода) органические соединения, например, лактат:



Накопленный фактический материал свидетельствует о том, что у растений и бактерий процессы фотосинтеза в основе своей одинаковы, хотя в них используются

разные доноры водорода. Сходство это становится явным, если написать уравнение фотосинтеза в более общей форме:



где H_2D – донор водорода, D – окисленная форма этого донора. Роль H_2D могут играть вода, сероводород, лактат или другие органические соединения в зависимости от вида фотосинтезирующего организма. В принципе у различных организмов фотосинтез протекает одинаково, хотя заметны и некоторые особенности в зависимости от вида фотосинтезирующих клеток. Наиболее вероятно, что на Земле первыми фотосинтезирующими организмами были бактерии, которые использовали H_2S как донор электронов.

Световая и темновая фазы фотосинтеза

Процесс фотосинтеза в растениях протекает в две стадии (рис. 16.2):

- **световые реакции**, идущие только тогда, когда растение освещено, вторая
- **реакции ассимиляции (фиксации) углерода**, иногда необоснованно называемые **темновыми**, которые регулируются продуктами, образовавшимися в световых реакциях

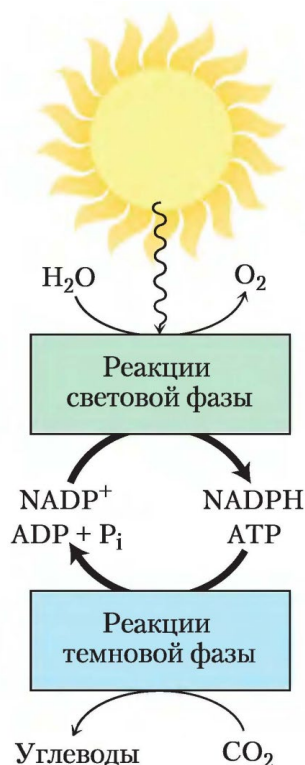


Рис. 16.2. Реакции световой и темновой фазы фотосинтеза

В световых реакциях энергия света поглощается хлорофиллом и другими пигментами фотосинтезирующих клеток и запасается в химической форме в виде двух

высокоэнергетических продуктов – АТФ и NADPH. Одновременно выделяется кислород. В реакциях фиксации углерода, для которых свет не требуется, АТФ и NADPH, образовавшиеся в световых реакциях, используются для восстановления углекислого газа до триозофосфата, крахмала и других органических продуктов.

Хлоропласты и светопоглощающие пигменты

В эукариотических фотосинтезирующих клетках как световые, так и реакции фиксации углерода протекают в хлоропластах, которые окружены двумя мембранами (рис. 16.3). Внешняя мембрана проницаема для небольших молекул и ионов, а внутренняя мембранная система ограничивает внутренний компартмент хлоропласта. В нём находится много плоских мембранных мешочков, или пузырьков, часто связанных с мембраной. Это *тилакоиды*, которые обычно собраны в стопки, называемые *гранами*. В тилакоидных мембранах (*ламеллах*) содержатся все фотосинтезирующие пигменты хлоропласта и все ферменты, необходимые для световых реакций и синтеза АТФ. Большинство ферментов, участвующих в реакциях фиксации углерода, находятся в жидкости, заполняющей внутренний компартмент хлоропласта и окружающей тилакоиды, её называют *стромой*.

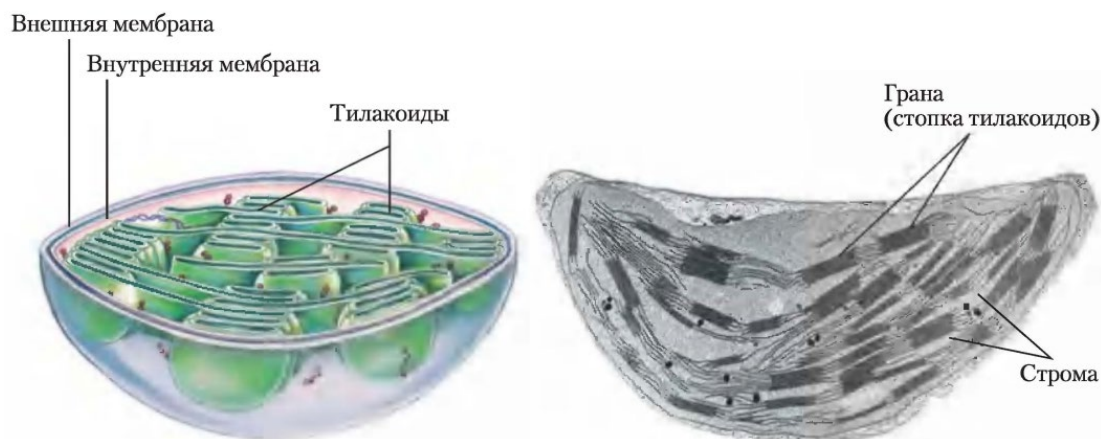


Рис. 16.3. Строение хлоропласта

Главную роль среди светопоглощающих пигментов тилакоидных мембран играют зелёные пигменты **хлорофиллы**. Это Mg_2^+ -содержащие молекулярные комплексы с полициклической плоской структурой, как у протопорфирина гемоглобина, но комплексообразователем является не Fe_2^+ , а Mg_2^+ . Четыре атома азота, обращённые в центр кольцевой структуры, координационно связаны с ионом Mg_2^+ (рис. 16.4). У всех хлорофиллов длинная изопреноидная боковая цепь – это остаток спирта фитола, присоединённого сложноэфирной связью к карбоксильной группе заместителя в кольце IV. В хлорофиллах, в отличие от гемов, есть пятое (непиррольное) кольцо.

Пятичленные гетероциклы вокруг иона Mg_2^+ образуют сопряжённую систему двойных и одинарных связей, которая даёт интенсивные характеристические полосы в

превышает количество хлорофилла *b*. Хлорофиллы водорослей и фотосинтезирующих бактерий слегка отличаются от хлорофиллов высших растений.

Молекулы хлорофилла всегда связаны со специальными белками, образуя светопоглощающие комплексы, в которых они определённым образом ориентированы относительно друг друга и к остальным белковым комплексам в мембране тилакоидов. Один светопоглощающий комплекс содержит семь молекул хлорофилла *a*, пять молекул хлорофилла *b* и две молекулы вспомогательного пигмента лютеина.

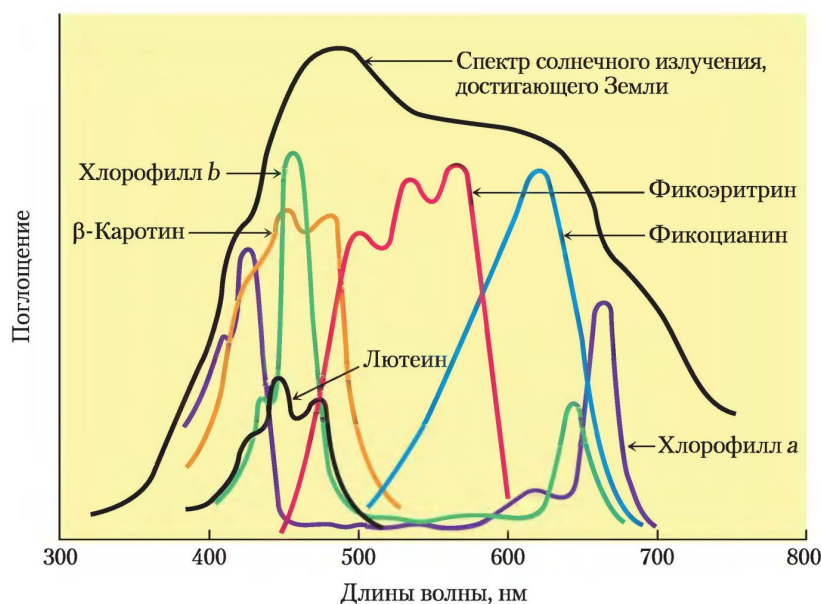


Рис. 16.5. Спектры поглощения фотопигментов в видимой области

У цианобактерий и красных водорослей рецепторы световой энергии представлены пигментами другого класса – это красные и синие фикобилины (фикоэритробилины и фикоцианобилины соответственно; рис. 16.4, б). Фикобилины – тетрапирролы с открытой цепью и с большим числом сопряжённых двойных связей. В отличие от хлорофилла фикобилины не содержат Mg^{2+} и не имеют циклической тетрапиррольной структуры. Фикобилипротеинами называются комплексы фикобилинов со специальными белками. Они организованы в крупные комплексы – фикобилисомы, которые служат главными светопоглощающими системами у этих микроорганизмов.

В мембранах тилакоидов наряду с хлорофиллами присутствуют также второстепенные, или вспомогательные, светопоглощающие пигменты. К ним относятся различные каротиноиды, окрашенные в жёлтый, красный и пурпурный цвета. Среди них наиболее важны красный пигмент изопреноидного строения β-каротин и жёлтый каротиноид лютеин (рис. 16.4, в и г). Каротиноиды поглощают свет в другом диапазоне длин волн, чем хлорофиллы, и поэтому функционируют как световые рецепторы, дополняющие хлорофиллы (рис. 16.5).

Благодаря способности поглощать световую энергию в определённой области длин волн фотосинтезирующие организмы могут занимать свою уникальную экологическую нишу. Например, пигменты фикобилины красных водорослей и цианобактерий поглощают свет в диапазоне 520-630 нм (рис. 16.5), что позволяет им выживать в окружении организмов, пигменты которых и сама вода поглощают свет в более коротковолновом или более длинноволновом диапазоне.

Поглощение света фотосистемой. Путь экситонов в хлоропластах

Светопоглощающие пигменты тилакоидных мембран собраны в функциональные комплексы – фотосистемы. Молекулы всех пигментов поглощают фотоны, но только некоторые молекулы хлорофиллов могут превращать свет в химическую энергию. Эти специализированные хлорофиллы связаны с особыми белками и образуют фотохимический реакционный центр. Все прочие молекулы пигментов называются светособирающими или антенными. Они поглощают свет и очень быстро передают его энергию фотохимическим реакционным центрам, где и происходит фотохимическая реакция (рис. 16.6).



Рис. 16.6. Строение фотосистемы в тилакоидной мембране

В процессе фотосинтеза происходит особый тип перехода возбуждённой молекулы в исходное состояние, который заключается в прямой передаче энергии

возбуждения от возбуждённой молекулы к соседней, находящейся в основном состоянии. Квант энергии, переданной от одной молекулы к другой, называется экситоном.

Преобразование поглощаемой энергии фотонов в транспорт зарядов в фотохимических комплексах хлоропластов осуществляется в несколько стадий:

1. Световая энергия переводит антенную молекулу (хлорофилл или вспомогательный пигмент) в возбужденное состояние, «подбрасывая» электрон на более высокий энергетический уровень.
2. Возбуждённая антенная молекула передаёт энергию соседней молекуле хлорофилла, переводя её в возбужденное состояние за счёт резонансного переноса энергии, а сама при этом возвращается в основное состояние
3. Энергия возбуждения (экситон) быстро мигрирует через третью, четвертую и т. д. молекулы пигмента к фотохимическому реакционному центру, в котором одна молекула хлорофилла в особой паре хлорофиллов типа а переходит в возбуждённое состояние
4. В возбуждённой молекуле хлорофилла один из электронов переходит на более высокую энергетическую орбиталь. Этот возбуждённый электрон покидает молекулу хлорофилла в реакционном центре и присоединяется к первому переносчику в цепи переноса электронов, оставляя в реакционном центре так называемую «дырку», обычно обозначаемую на схемах знаком «+»
5. Первый переносчик в цепи переноса электронов оказывается восстановленным, поскольку он присоединяет электрон, а реакционный центр – окисленным, поскольку он отдал свой электрон. Потеря электрона молекулой хлорофилла в реакционном центре восполняется электроном от соседней электронодонорной молекулы, приобретающей положительный заряд.

Таким образом, световая энергия, поглощаемая хлоропластами, индуцирует цепь окислительно-восстановительных реакций.

Фотохимическая система типа II (феофитин-хиноновая) у пурпурных бактерий

Фотохимическая реакционная система у фотосинтезирующих бактерий относительно простая и включает один из двух главных типов реакционных центров. У пурпурных бактерий есть реакционный центр, от которого возбуждённые электроны через переносчик электронов феофитин (хлорофилл, не содержащий ион Mg^{2+}) поступают к хинону.

Фотосинтезирующий ансамбль пурпурных бактерий включает три основных компонента (рис. 16.7, а):

- реакционный центр, содержащий пигмент P870
- переносчик электронов – цитохромный комплекс bc_1 близкий по строению к комплексу III в митохондриальной цепи переноса электронов

- комплекс АТР-синтазу, аналогичный АТР-синтазному комплексу в дыхательной цепи митохондрий.

При освещении фотосинтезирующих клеток выброшенные из реакционного центра электроны поступают через феофитин и хинон к цитохромному комплексу bc_1 и затем вновь возвращаются в реакционный центр через цитохром c_2 на прежнюю энергетическую орбиталь. Индуцированный светом циклический поток электронов высвобождает энергию для перекачивания протонов из среды в тилакоид с помощью цитохромного комплекса bc_1 , в результате чего возникает трансмембранный градиент H^+ . При возврате ионов H^+ наружу через АТР-синтазу происходит синтез АТР, так же как в митохондриях.

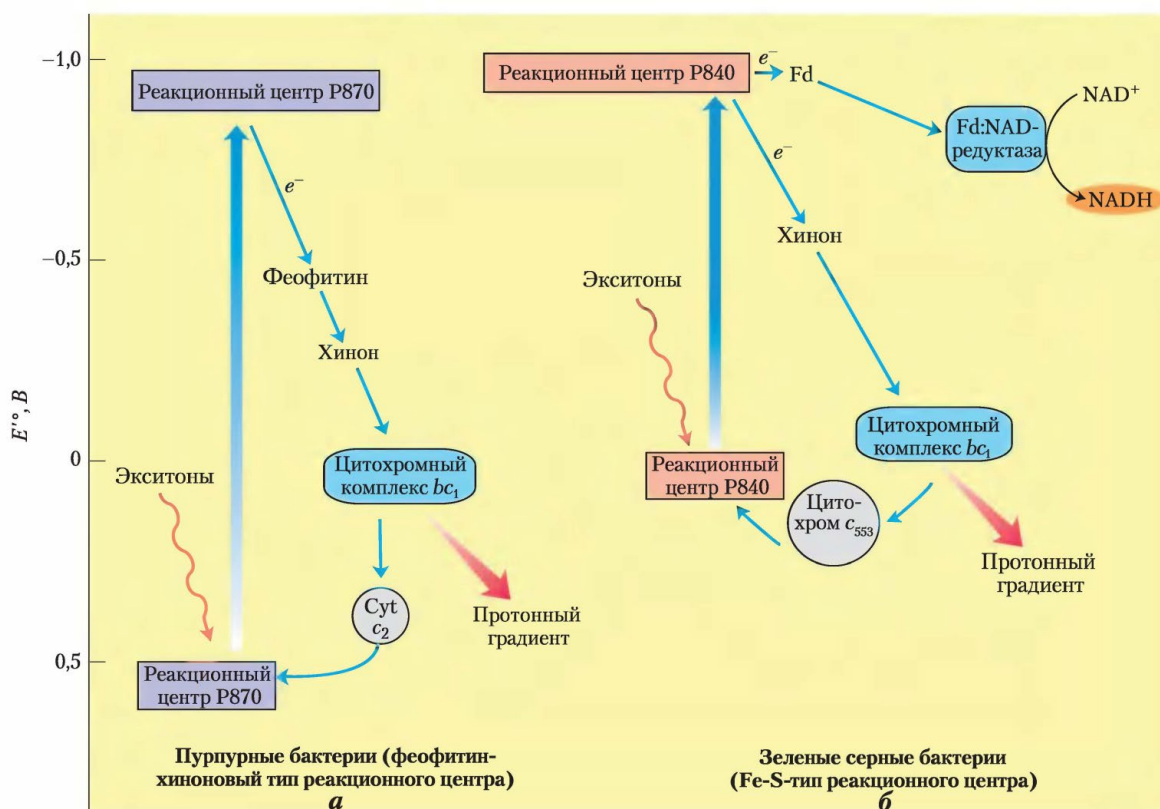


Рис. 16.7. Световые реакции у пурпурных (а) и зеленых серных бактерий (б)

Цитохромный комплекс bc_1 пурпурных бактерий, подобно комплексу III в дыхательной цепи митохондрий, переносит электроны от донора (молекулы хинона) к акцептору электронов, а высвобождающаяся при этом энергия используется для перекачивания протонов через мембрану. Путь электронов через комплекс bc_1 напоминает путь электронов через комплекс III в дыхательной цепи митохондрий, включенной в Q-цикл, в результате которого создаётся трансмембранный градиент рН. Конечным акцептором электронов в клетках пурпурных бактерий является потерявший электрон реакционный центр P870. Электроны, выброшенные реакционным центром P870, движутся от цитохромного комплекса bc_1 через цитохром c_2 снова к

реакционному центру. Таким образом, при освещении пурпурных бактерий электроны совершают циклические переходы – покидают реакционный центр фотосистемы и вновь возвращаются в него на прежние невозмущённые орбитали, в результате чего реакционный центр переходит в восстановленное состояние и способен снова поглощать экситон от антенных молекул хлорофилла.

Фотохимическая система типа I (Fe-S-система) у зелёных серных бактерий

У зелёных серных бактерий электроны переносятся через хинон к железосерному белку. Однако кроме функциональных ансамблей, характерных для пурпурных бактерий, в фотосинтезе участвуют дополнительные ферментные комплексы (рис. 16.7, б) и пути переноса электронов.

Во-первых, у зелёных серных бактерий существует циклический поток, когда выброшенные из реакционного центра электроны присоединяются первым переносчиком электронов хиноном Q, а затем переходят к цитохромному комплексу bc_1 . Этот процесс сопровождается транспортом протонов через мембрану тилакоидов и возникновением протон-движущей силы, поставляющей энергию для синтеза АТФ, как это происходит у пурпурных бактерий и в дышащих митохондриях.

Во-вторых, у них кроме циклического потока существует ещё поток электронов другого типа, также индуцируемый светом – нециклический. В нециклическом потоке часть выброшенных из реакционного центра электронов движется к железосерному белку ферредоксину, а затем через флавопротеин ферредоксин-NAD-редуктазу к NAD^+ , восстанавливая последний до NADH. Таким образом, электроны всё время движутся в одном направлении.

Электроны, ушедшие из реакционного центра на восстановление NAD^+ , заменяются электронами, полученными при окислении H_2S до элементной серы, а затем до SO_4^{2-} (то есть в реакциях, характерных для фотосинтеза зелёных серных бактерий). Процесс окисления H_2S бактериями сходен с процессом окисления H_2O растениями-продуцентами кислорода.

Лекция 17. Реакции ассимиляции. Цикл Кальвина

Взаимодействие двух фотосистем у растений

У современных цианобактерий, водорослей и сосудистых растений более сложный фотосинтезирующий аппарат, чем у фотосинтезирующих бактерий, у которых есть только один тип фотохимической реакционной системы. Фотосинтезирующие системы сложных клеток, по-видимому, являются комбинацией двух простых бактериальных фотосистем, работающих взаимосогласованно и составляющих единую последовательность рабочих звеньев. В тилакоидных мембранах хлоропластов присутствуют два типа фотохимических систем, каждая со своим собственным ансамблем светопоглощающих пигментов (антенных молекул) и реакционным центром для захвата энергии. Каждая система имеет свои основные и дополнительные функции.

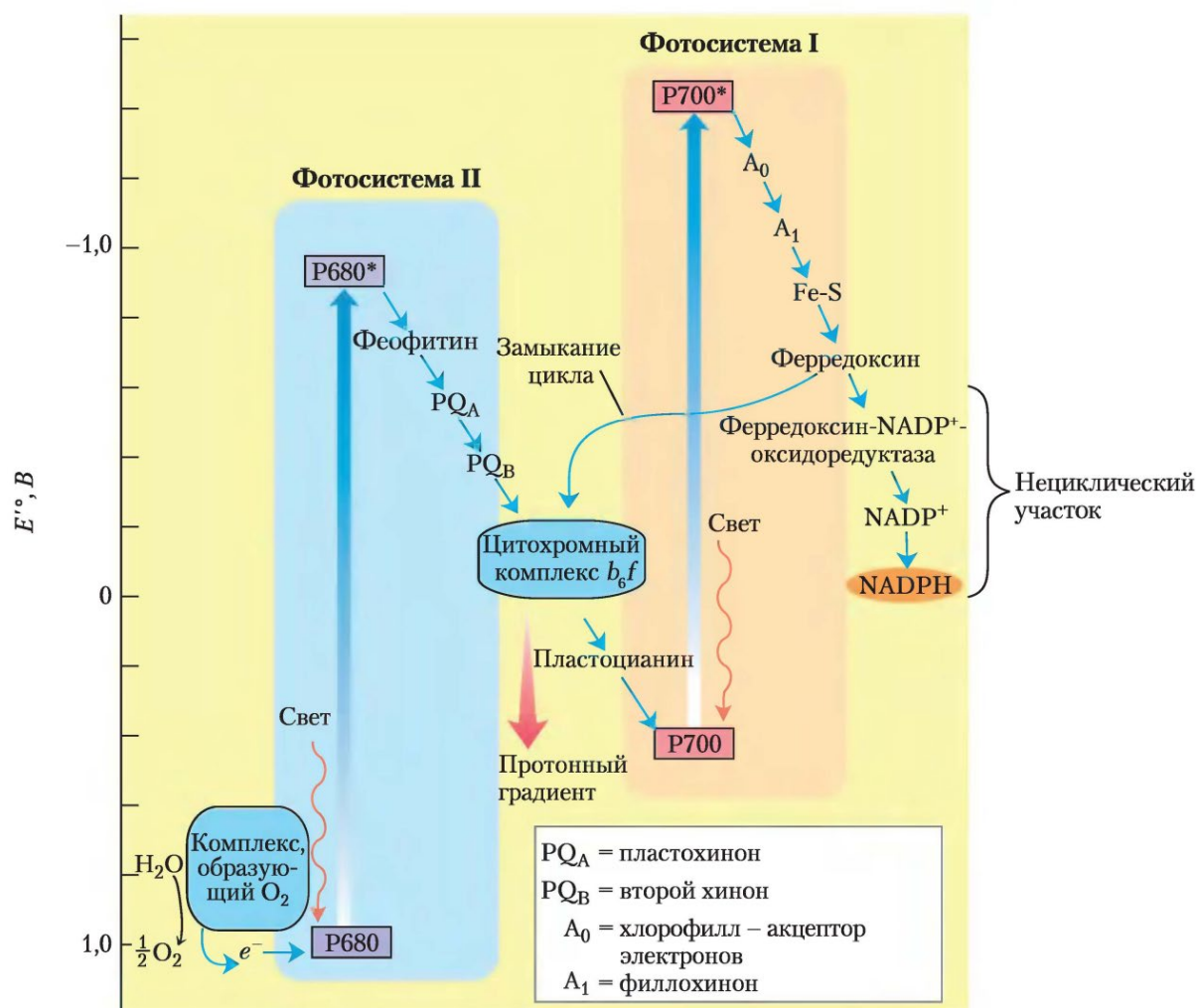


Рис. 17.1. Совместное действие фотосистем I и II в хлоропластах

Фотосистема II (ФС II), феофитин-хиноновая, аналогична единственной фотосистеме пурпурных бактерий. Она включает примерно одинаковые количества

молекул хлорофилла а и b. Реакционный центр фотосистемы II содержит пигмент P680, при возбуждении которого электроны выводятся из систем через цитохромный комплекс b6f, что сопряжено с переносом протонов через тилакоидную мембрану.

Фотосистема I (ФС I) по строению и функциям аналогична фотосинтезирующей системе типа I у зелёных серных бактерий. Она характеризуется высоким соотношением между количеством хлорофилла а и хлорофилла b и имеет в реакционном центре пигмент P700, способный захватывать экситоны с последующей передачей электрона через железо-серный белок ферредоксин к NADP^+ , переводя его в восстановленное состояние NADPH. У шпината в тилакоидных мембранах одного хлоропласта имеются сотни фотосистем того и другого типа.

У растений фотосистемы I и II функционируют совместно в реакциях фотосинтеза, от которых зависит движение электронов от H_2O к NADP^+ (рис. 17.1). Перенос электронов между двумя фотосистемами осуществляет водорастворимый белок **пластоцианин** (одноэлектронный переносчик). По своим свойствам он аналогичен цитохрому c в митохондриях. «Дырки» от электронов, ушедших из системы ФС II к NADP^+ , у цианобактерий и растений, выделяющих кислород, заполняются электронами, поступающими от H_2O при окислении. В отличие от фотосинтеза у пурпурных и зеленых серных бактерий, окисляющих H_2S и не выделяющих кислород, такой процесс называется **окисленным фотосинтезом**.

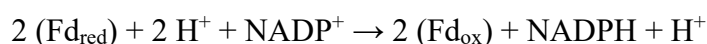
Во всех фотосинтезирующих клетках, выделяющих кислород, то есть в клетках высших растений, водорослей и цианобактерий, содержатся обе фотосистемы I и II. У фотосинтезирующих бактерий, не выделяющих кислород, есть только одна фотосистема. На рис. 17.1 приведена **Z-схема**, называемая так из-за её зигзагообразной формы. Она позволяет проследить поток электронов между фотосистемами I и II, а также энергетические взаимоотношения этих двух фотосистем в световых реакциях. Таким образом, Z-схема описывает весь путь, по которому электроны переходят от H_2O к NADP^+ согласно уравнению:



На каждый электрон, переходящий от H_2O к NADP^+ , поглощаются два кванта света, по одному на каждую фотосистему. Для образования одной молекулы O_2 от H_2O к NADP^+ должны быть переданы четыре электрона, то есть должно быть поглощено восемь квантов – по четыре на каждую фотосистему.

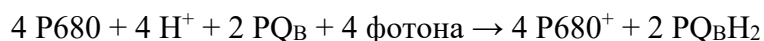
В **фотосистеме I** под действием квантов света реакционный центр P700 переходит в возбуждённое состояние P700* и легко отдаёт электрон акцептору A_0 (особая форма хлорофилла), функции которого сходны с функциями феофитина в фотосистеме II. В результате этого процесса образуется A_0^- и «дырка» P700⁺, то есть энергия света вызывает разделение зарядов в фотохимическом реакционном центре. Молекула пигмента после потери электрона (P700⁺) становится очень сильным окислителем и очень быстро присоединяет электрон от пластоцианина – растворимого

медьсодержащего голубого белка, который служит непосредственным донором электронов для «дырок» в реакционном центре P700 фотосистемы I. A_0^- – исключительно сильный восстановитель; он переносит свой электрон по цепи переноса электронов к $NADP^+$. Первым переносчиком в цепи переноса электронов от A_0^- к $NADP^+$ является **филлохинон** A_1 . Второй переносчик электронов – железосерный белок с тремя FeS-центрами. Третий – другой железосерный белок **ферредоксин** Fd. Роль четвертого переносчика электронов играет флавопротеин **ферредоксин-NADP-оксиредуктаза**. Этот фермент переносит электроны от восстановленного ферредоксина (Fd_{red}) к $NADP^+$, восстанавливая последний в NADPH.



Этот фермент по своим функциям и строению аналогичен ферредоксин-NAD-редуктазе зелёных серных бактерий.

Поглощение световой энергии реакционным центром P680 в **фотосистеме II** переводит пигмент P680 в возбужденное состояние $P680^*$, в котором он легко теряет электроны. Поступающие от возбужденного реакционного центра электроны переносятся за несколько пикосекунд к феофетину, преобразуя его в $\bullet Pheo^-$. При потере электрона $P680^*$ переходит в катион-радикал $P680^+$. $\bullet Pheo^-$ очень быстро передаёт электрон связанному с белком пластохинону PQ_A , или Q_A . Восстановленная форма пластохинона PQ_A в свою очередь передаёт электроны пластохинону PQ_B , или Q_B , не связанному с белком. После получения двух электронов от PQ_A и двух протонов от молекул воды пластохинон PQ_B переходит в полностью восстановленную хинольную форму PQ_BH_2 . Уравнение этой индуцируемой светом реакции в фотосистеме II можно записать следующим образом:



В итоге восстановленная форма пластохинона PQ_BH_2 передает электроны цитохромному комплексу b_6f , который препятствует фотосинтезу АТФ (рис. 17.1). «Дырки» в реакционном центре P680 фотосистемы II заполняются электронами, отщепляемыми от воды в процессе её окисления. При расщеплении двух молекул воды образуются четыре электрона, четыре протона и молекулярный кислород. Квантовая потребность этой фотолитической реакции расщепления равна четырём фотонам. Реакция катализируется Mn-содержащим белковым комплексом.

Поток электронов от ФСII к цитохромному комплексу b_6f и далее через ФСI к $NADP^+$ иногда называют **нециклическим потоком электронов**, чтобы отличить его от **циклического потока электронов**, которые зависят главным образом от условий освещения. Нециклический поток создаёт протонный градиент, который расходуется на синтез АТФ и NADPH, который используется в биосинтезе. В циклический поток электронов вовлекается только фотосистема I (рис. 17.1), ФСII не участвует. Циклическим этот поток называется потому, что электроны, выброшенные реакционным центром P700 при освещении ФСI и присоединённые к ферредоксину, не

переходят затем к NADP^+ , а возвращаются через цитохромный комплекс b_6f к пластоцианину, как это происходит у зелёных серных бактерий (рис. 16.7, б).

Пластоцианин отдаёт электроны реакционному центру P700, который их вновь перебрасывает ферредоксину. Таким образом, при освещении ФСІ электроны могут совершать циклические переходы – покидать реакционный центр ФСІ и вновь возвращаться в него. Энергия, необходимая для проведения одного электрона через такой цикл, обеспечивается поглощением одного кванта света. Циклический поток электронов не сопровождается образованием NADPH и выделением кислорода, однако ему сопутствует фосфорилирование ADP до ATP – так называемое **циклическое фотофосфорилирование**.

Нециклический поток электронов, направленный на восстановление NADP^+ , и циклическое фотофосфорилирование включаются в растительной клетке в зависимости от её потребности в ATP и NADPH , необходимых для ассимиляции углерода и других биосинтетических процессов. Для успешной ассимиляции углерода растительная клетка должна быть обеспечена ATP и NADPH в соотношении 3 : 2.

Во время фотосинтеза у растений реакции расщепления воды и процесс переноса электронов через цитохромный комплекс b_6f сопровождаются перекачиванием протонов через мембрану тилакоидов. Создаваемая при этом протон-движущая сила служит источником энергии для синтеза ATP ферментным комплексом CF_0CF_1 , строение и функция которого аналогичны митохондриальному комплексу F_0F_1 . ATP -синтаза хлоропластов (CF_0CF_1) по структуре и каталитическому механизму очень напоминает ATP -синтазу из митохондрий и бактерий. Физическое вращение, направляемое градиентом протонов, сопровождается синтезом ATP .

Особенности фотосинтеза галофитных бактерий

У некоторых современных архей реализуется несколько иной механизм превращения энергии света в электрохимический градиент. Древняя сохранившаяся в ходе эволюционного развития галофильная (любящая соль) бактерия *Halobacterium salinarum* запасает энергию солнечного света совершенно иным способом, нежели это делают истинные фотосинтезирующие организмы. Эта своеобразная бактерия обитает только в водоёмах с солёной водой (прудах и соляных озёрах, например, в Большом Солёном озере и в Мёртвом море), то есть там, где из-за испарения воды концентрация соли может превышать 4 М. Эти бактерии вообще не способны существовать при концентрациях NaCl ниже 3 М. Будучи аэробами, они обычно используют для окисления своего органического «топлива» кислород. Однако в воде соляных водоёмов растворимость кислорода очень низкая. Поэтому галофильным бактериям иногда приходится использовать другой источник энергии – солнечный свет.

В цитоплазматической мембране бактерии *H. salinarum* имеются скопления светопоглощающих пигментов, состоящие из молекул белка бактериородопсина, содержащего в качестве простетической группы остаток ретиналя – альдегида

витамина А. При освещении *полностью транс*-ретинаяль, связанный с бактериородопсином, поглощает фотон и претерпевает фотоизомеризацию в *13-цис*-ретинаяль. При возвращении в первоначальную *полностью транс*-конфигурацию выделяется энергия, которая используется на перекачивание протонов из клетки в наружную среду.

Молекула бактериородопсина выполняет функцию простейшего белкового насоса, который под действием света выкачивает протоны наружу. На рис. 17.2 изображена структура бактериородопсина в темноте и на свету, а также показан путь протонов через мембрану путём последовательности согласованных «прыжков». В бактериородопсине хромофор ретинаяль присоединен к ε-аминогруппе остатка Lys через основание Шиффа. В темноте атом азота в нём протонируется. На свету происходит фотоизомеризация ретинаяля, в результате чего pK_a основания Шиффа понижается и от атома N отщепляется протон, который присоединяется к соседнему остатку Asp. Происходит серия протонных «прыжков», в результате чего протон переходит с внешней поверхности мембраны в наружную среду. Это приводит к возникновению трансмембранного градиента pH с более кислой средой снаружи.

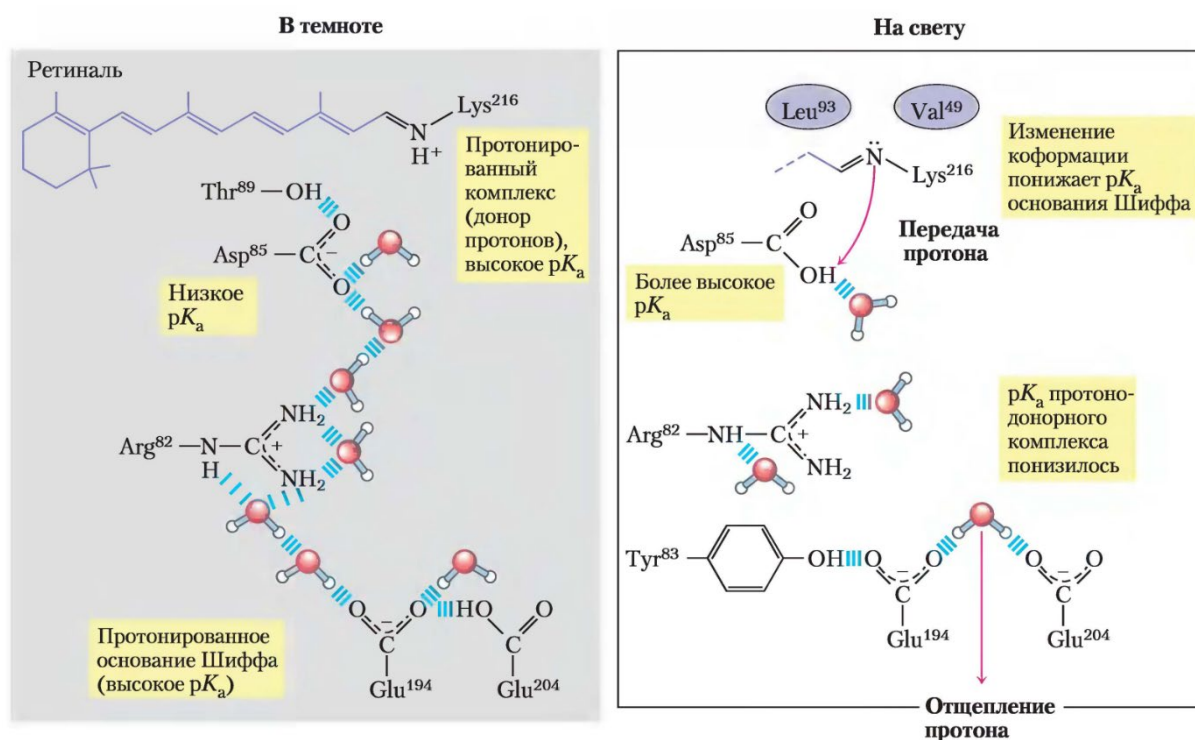


Рис. 17.2. Механизм перекачивания протонов у галофильных архей

Поскольку концентрация ионов H^+ снаружи оказывается выше, чем внутри, эти ионы стремятся диффундировать обратно в клетку через находящиеся в мембране молекулы фермента АТР-синтазы, похожей на АТР-синтазу митохондрий и хлоропластов. Проходя через эту бактериальную АТРаду, ионы H^+ отдают свою энергию, которая используется для синтеза АТР из АДФ и фосфата.

Таким способом галофильные бактерии при отсутствии O_2 запасают световую энергию в форме АТФ в дополнение к АТФ, синтезированному путём окислительного фосфорилирования при наличии кислорода. Однако галофильные бактерии не выделяют кислород и не осуществляют фотовосстановление $NADP^+$. Процессы светозависимого преобразования энергии у галофильных бактерий проще, чем у цианобактерий или растений.

Темновые стадии. Фиксация CO_2

Светозависимый синтез $NADPH$ и АТФ поставляет энергию и восстановительный потенциал для фиксации CO_2 в триозы, из которых синтезируются все углеводсодержащие соединения растительной клетки (рис. 17.3).

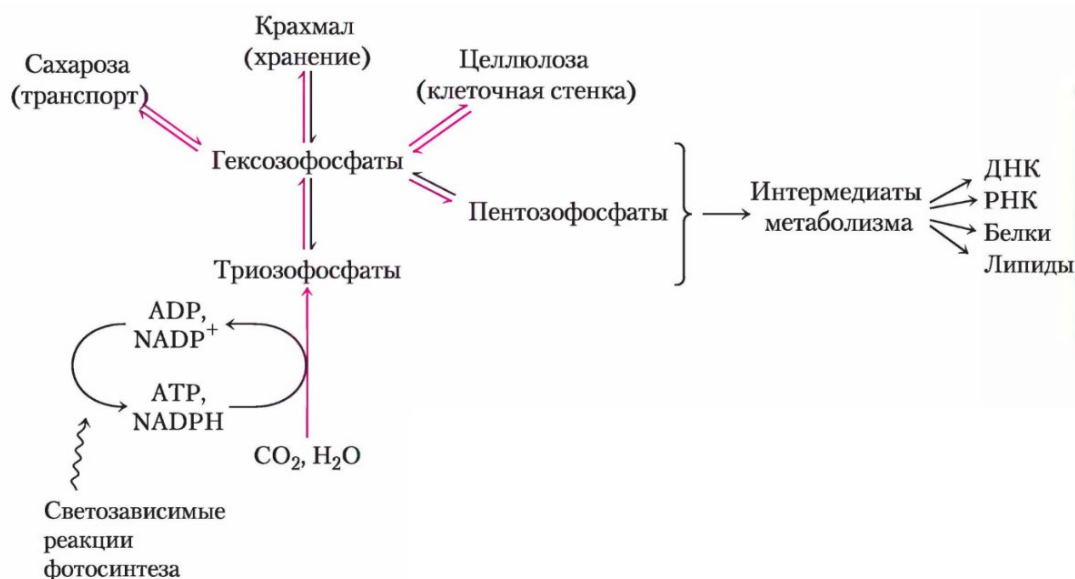


Рис. 17.3. Включение CO_2 в биомассу растений

Зелёные растения содержат в своих хлоропластах уникальный ферментный комплекс, катализирующий превращение CO_2 в простые (восстановленные) органические соединения. Такой процесс называется **ассимиляцией** или **фиксацией CO_2** (или просто **фиксацией углерода**). Это специфическая реакция, в ходе которой CO_2 включается (фиксируется) в трёхуглеродное соединение – триозофосфат-3-фосфоглицерат. Этот простой продукт фотосинтеза – предшественник более сложных биомолекул (сахаров, полисахаридов и метаболитов), которые синтезируются в метаболических путях, похожих на аналогичные в животных тканях. Растения, в которых трёхуглеродное соединение 3-фосфоглицерат оказывается первым интермедиатом в фотосинтезе, называют **C3- растениями**, чтобы отличить их от **C4- растений**, которые будут описаны ниже.

CO_2 ассимилируется через циклический путь, который называется **циклом Кальвина** или, более описательно, **циклом фотосинтетического восстановления углерода**. Его ключевые интермедиаты постоянно возобновляются.

Ассимиляция углекислого газа происходит в три стадии (рис. 17.4):

1. Реакция фиксации углерода: конденсация CO_2 с пятиуглеродным акцептором рибулозо-1,5-бисфосфатом с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата.
2. 3-Фосфоглицерат восстанавливается до триозофосфатов. В итоге три молекулы CO_2 фиксируются в трёх молекулах рибулозо-1,5-бисфосфатов, образуются шесть молекул глицеральдегид-3-фосфата (18 атомов углерода) в равновесии с дигидроксиацетонфосфатом.
3. Пять из шести молекул триозофосфата (15 атомов углерода) используются для восстановления трёх молекул рибулозо-1,5-бисфосфата (15 атомов), стартового соединения. Шестая молекула триозофосфата, конечного продукта фотосинтеза, может использоваться в синтезе гексоз – топливных и строительных материалов, сахарозы – для транспорта в нефотосинтезирующие ткани или крахмала – для запасаания.

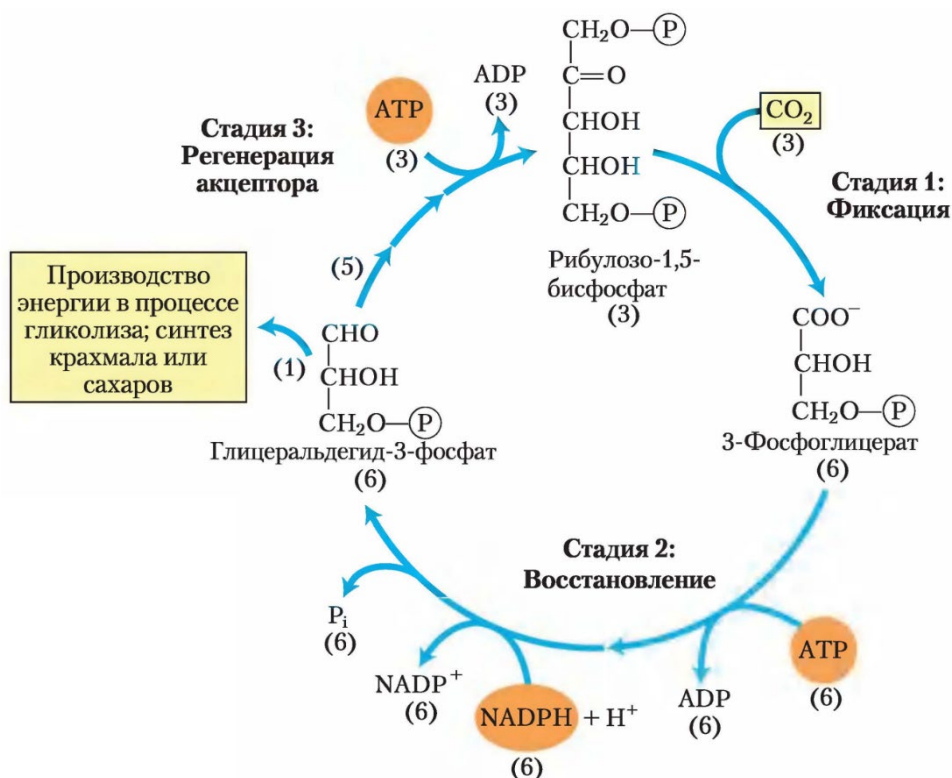


Рис. 17.4. Три стадии ассимиляции CO_2 у фотосинтезирующих организмов

Фермент рубиско

Включение CO_2 в органические соединения катализирует фермент рубиско – рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа. Как карбоксилаза, рубиско катализирует ковалентное присоединение CO_2 к пятиуглеродному сахару рибулозо-1,5-бисфосфату и расщепляет нестабильный шестиуглеродный интермедиат с образованием двух молекул 3-фосфоглицерата, одна из которых несёт углерод, введённый как CO_2 в карбоксигруппу (рис. 17.4).

Существуют две разные формы рубиско. Форму I содержат сосудистые растения, водоросли и цианобактерии, а форма II есть только у фотосинтезирующих бактерий.

Рубиско растений – ключевой фермент при образовании биомассы из CO_2 . Он представлен формой I – восемь идентичных больших субъединиц (каждая субъединица содержит каталитический центр) и восемь одинаковых малых субъединиц с неопределённой функцией. Форма II рубиско фотосинтезирующих бактерий содержит две субъединицы, которые во многом напоминают большие субъединицы растительного фермента. Особенность этого растительного фермента – низкое число оборотов: только три молекулы CO_2 в секунду фиксируются рубиско при 25°C . Для достижения высокой скорости фиксации CO_2 растения нуждаются в большом количестве этого фермента. Рубиско составляет почти 50% растворимых белков в хлоропластах, и, вероятно, это один из самых распространённых белков в биосфере.

В предполагаемом механизме с участием растительного рубиско центральную роль играет карбамоилированная боковая цепь Lys и связанный с ней Mg_2^+ .

Фермент неактивен, пока ϵ -группа Lys некарбамоилирована. Рибулозо-1,5-бисфосфат ингибирует карбамоилирование, прочно связываясь с активным центром и блокируя фермент в «закрытой» конформации, в которой Lys недоступен. Рубиско-активаза снимает ингибирование посредством АТФ-зависимого высвобождения рибулозо-1,5-бисфосфата, экспонируя аминокгруппу Lys для неферментативного карбамоилирования с помощью CO_2 . Этот процесс следует за связыванием Mg_2^+ , которое активирует рубиско. У некоторых видов рубиско-активазы активируется светом по окислительно-восстановительному механизму.

Другой регуляторный механизм вовлекает «темновой ингибитор» 2-карбоксирабинитол-1-фосфат, природный аналог переходного состояния со структурой, похожей на β -кетокислоту – интермедиат в реакции рубиско. Это соединение, синтезирующееся некоторыми растениями в темноте – мощный ингибитор карбамоилированной рубиско. Оно либо распадается при освещении, либо вытесняется рубиско-активазой, активируя рубиско.

Цикл Кальвина

Рассмотрим реакции регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата из триозофосфатов. В результате первой реакции ассимиляции CO_2 в триозофосфаты расходуется рибулозо-1,5-бисфосфат, и для непрерывного превращения CO_2 в углеводы рибулозо-1,5-бисфосфат должен постоянно регенерироваться. Это выполняется в серии реакций (рис. 17.5), что вместе со стадиями 1 (фиксация) и 2 (восстановление) составляет циклический путь, показанный на рис. 17.4. Продукт первой реакции (3-фосфоглицерат) процесса ассимиляции подвергается различным превращениям, в результате которых образуется рибулозо-1,5-бисфосфат. Интермедиаты этого пути представляют собой трёх-, четырёх-, пяти-, шести- и семиуглеродные сахара.

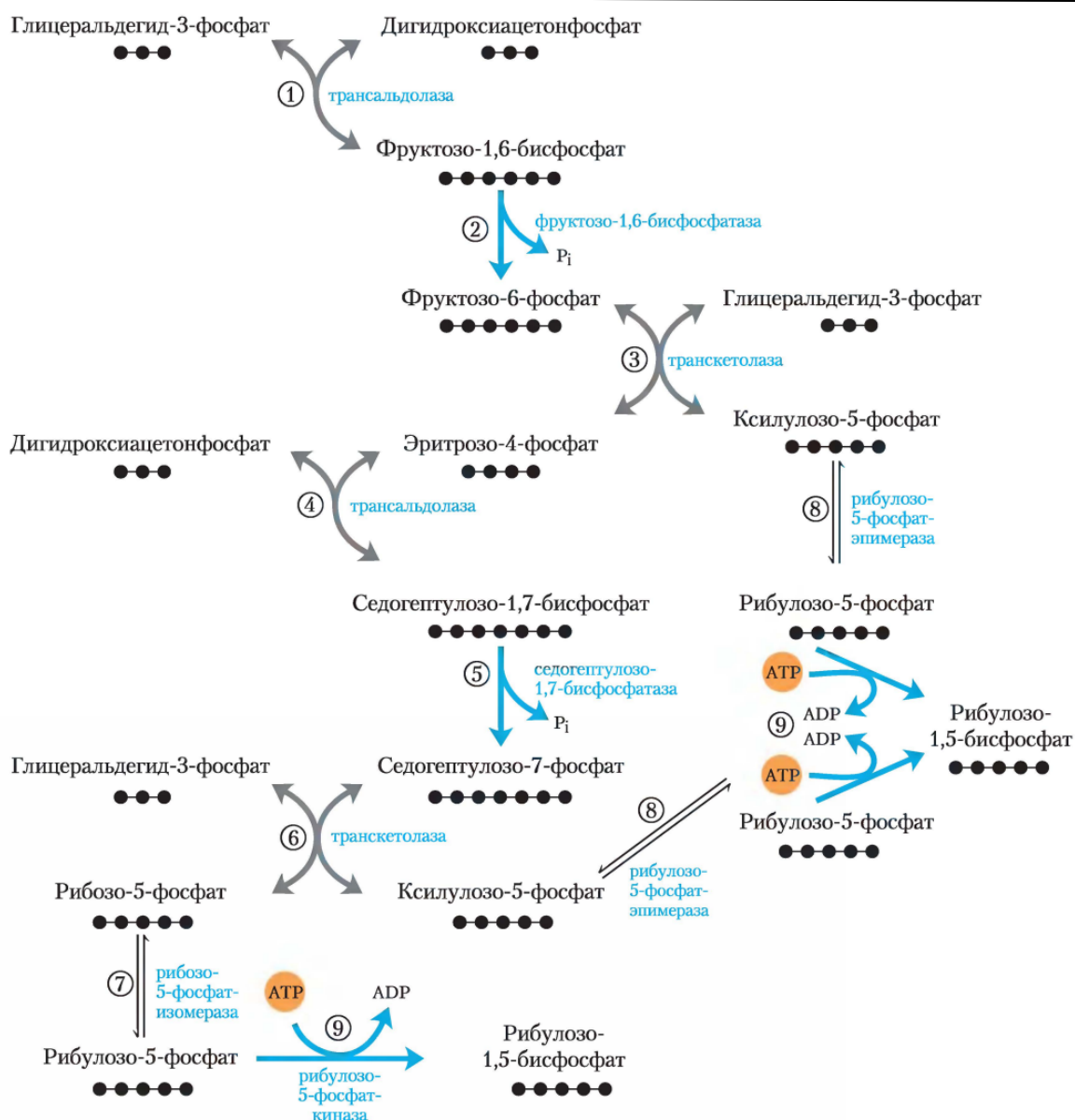


Рис. 17.5. Взаимопревращение триозофосфатов и пентозофосфатов

① Альдолаза катализирует обратимую конденсацию глицеральдегид-3-фосфата с дигидроксиацетонфосфатом, образуя фруктозо-1,6-бисфосфат.

② Фруктозо-1,6-бисфосфат расщепляется фруктозо-1,6-бисфосфатазой (ФБФаза-1) на фруктозо-6-фосфат и P_i . Эта реакция сильно экзотермична и по сути необратима.

③ Транскетолаза катализирует обратимый перенос двухуглеродной кетольной группы ($CH_2OH-CO-$) с кетозофосфатного донора фруктозо-6-фосфата на альдозофосфатный акцептор глицеральдегид-3-фосфат, образуя пентозу ксилулозо-5-фосфат и тетроз эритрозо-4-фосфат. Транскетолаза содержит тиаминпирофосфат (ТРР) в качестве протетической группы. Для её функционирования требуется Mg^{2+}

④ Снова действует трансальдолаза, конденсируя эритрозо-4-фосфат с дигидроксиацетонфосфатом с образованием семиуглеродного сахара седогептулозо-1,7-бисфосфата.

⑤ Фермент седогептулозо-1,7-бисфосфатаза, уникальный для пластид, превращает седогептулозо-1,7-бисфосфат в седогептулозо-7-фосфат. В данном пути это вторая необратимая реакция.

⑥ Снова работает транскетолаза, превращая седогептулозо-7-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат в два пентозофосфата. На этой стадии двухуглеродный фрагмент временно переносится на транскетолазный кофактор TPP и конденсируется с тремя атомами углерода глицеральдегид-3-фосфата.

⑦ Рибозо-5-фосфат, образованный в транскетолазной реакции ⑥, изомеризуется в рибулозо-5-фосфат.

⑧ Ксилулозо-5-фосфат, образованный в транскетолазной реакции ⑥, эпимеризуется в рибулозо-5-фосфат.

⑨ Рibuлозо-5-фосфат фосфорилируется до рibuлозо-1,5-бисфосфата рibuлозо-5-фосфаткиназой. Это третья экзотермическая реакция данного пути, поскольку происходит «замена» высокоэнергетической фосфоангидридной связи АТР на фосфоэфирную связь в рibuлозо-1,5-бисфосфате.

В результате трёх оборотов цикла Кальвина из трёх молекул CO_2 и одной молекулы фосфата образуется одна молекула триозофосфата. Три молекулы рibuлозо-1,5-бисфосфата (всего 15 атомов углерода) конденсируются с тремя молекулами CO_2 (три атома углерода) с образованием шести молекул 3-фосфоглицерата (18 атомов углерода). Эти шесть молекул 3-фосфоглицерата восстанавливаются до шести молекул глицеральдегид-3-фосфата (или дигидроксиацетонфосфата) с расходом шести АТР (при синтезе 1,3-бисфосфоглицерата) и шести NADPH (при восстановлении 1,3-бисфосфоглицерата до глицеральдегид-3-фосфата).

Одна молекула глицеральдегид-3-фосфата является итоговым продуктом пути ассимиляции углерода. Другие пять молекул триозофосфата (15 атомов углерода) перегруппировываются (изображено на стадиях ①-⑨ рис. 17.5) с образованием трёх молекул рibuлозо-1,5-бисфосфата (15 атомов углерода). Последняя стадия требует одну молекулу АТР на одну молекулу рibuлозо-1,5-бисфосфат, то есть всего 3 АТР. В итоге, на каждую молекулу триозофосфата, полученную при фотосинтетической ассимиляции CO_2 , приходится шесть NADPH и девять АТР.

NADPH и АТР производятся в светозависимых реакциях фотосинтеза примерно в том же соотношении (2 : 3), в котором они потребляются в цикле Кальвина. Девять молекул АТР превращаются в ADP и фосфат при синтезе молекулы триозофосфата. Восемь фосфатов высвобождаются в виде P_i и конденсируются с восемью молекулами ADP, регенерируя АТР. Девятый фосфат включается в триозофосфат. Для превращения девятой молекулы ADP в АТР, фосфат должен быть импортирован из цитозоля.

Таким образом, «стоимость» трёх фиксированных в триозофосфате CO_2 – девять молекул АТФ и шесть молекул NADPH, которые синтезируются в световых реакциях фотосинтеза.

Пластиды

Все растения содержат **пластиды** – самовоспроизводящиеся органеллы, ограниченные двойной мембраной и содержащие небольшой геном, который кодирует некоторые белки пластид. Белки, предназначенные для пластид, как правило, закодированы в ядерных генах, которые транскрибируются и транслируются, как другие ядерные гены, а затем эти белки транспортируются в пластиды. Пластиды воспроизводятся делением надвое, реплицируя свой геном (единственную циклическую молекулу ДНК) и используя свои собственные ферменты и рибосомы для синтеза белков, кодированных в этом геноме. В пластиде происходит большинство процессов биосинтеза растений: ассимиляция CO_2 , синтез аминокислот, тиамина, пиродоксальфосфата, флавинов и витаминов А, С, Е и К.

Хлоропласты служат центрами ассимиляции CO_2 . Белки, необходимые для этого процесса, содержатся в **строме** – растворимой фазе, ограниченной внутренней мембраной хлоропласта. **Амилопласты** – это неокрашенные пластиды (в них нет хлорофилла и других пигментов, найденных в хлоропластах). У них нет внутренних мембранных аналогов фотосинтетических мембран (тилакоидов) хлоропластов, и в растительных тканях, богатых крахмалом, эти пластиды наполнены крахмальными зёрнами. Хлоропласты могут терять внутренние мембраны и хлорофилл и превращаться в **пропластиды**, а пропластиды могут переходить в амилопласты. В свою очередь и амилопласты, и пропластиды могут преобразоваться в **прегранальные пластиды**, а затем вновь стать зрелыми хлоропластами (рис. 17.6).



Рис. 17.6. Пластиды: происхождение и взаимопревращение

Относительное содержание пластид зависит от типа растительной ткани и интенсивности освещения. Клетки зеленых листьев богаты хлоропластами, а в нефотосинтезирующих тканях, таких как картофельные клубни, доминируют амилопласты, которые содержат большое количество крахмала.

Внутренняя мембрана всех типов пластид непроницаема для полярных и заряженных молекул. Перенос через мембрану управляется набором специфических транспортеров.

Пути превращения синтезированных триозофосфатов

3-Фосфоглицерат, образовавшийся на первой стадии, превращается в глицеральдегид-3-фосфат в две стадии, которые по сути есть обратные реакции соответствующих стадий гликолиза с одним отличием: в качестве нуклеотидного кофактора для восстановления 1,3-бисфосфоглицерата вместо NADH используется NADPH (рис. 17.7). Строма хлоропласта содержит все гликолитические ферменты, кроме фосфоглицератмутазы. Стромальные и цитозольные ферменты – изозимы. Оба набора ферментов катализируют одинаковые реакции, но продуцируются разными генами.

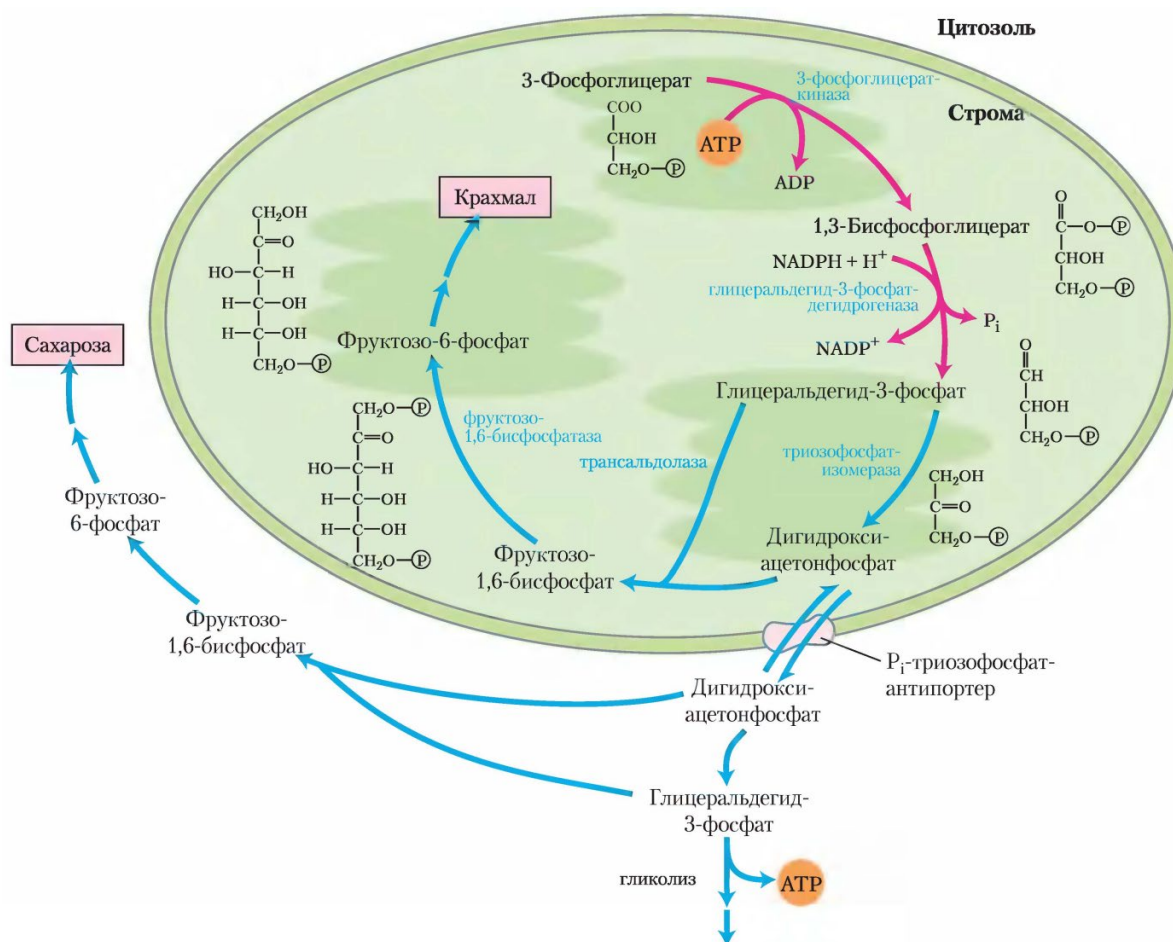


Рис. 17.7. Вторая стадия ассимиляции CO₂

В первой реакции второй стадии стромальный фермент 3-фосфоглицераткиназа катализирует перенос фосфорильной группы с АТФ на 3-фосфоглицерат, превращая его в 1,3-бисфосфоглицерат. Затем, хлоропласт-специфичный изозим глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа восстанавливает 1,3-бисфосфат, окисляя NADPH, с образованием глицеральдегид-3-фосфата и P_i .

Триозофосфатизомераза осуществляет взаимопревращение глицеральдегид-3-фосфата и дигидроксиацетонфосфата. Большинство молекул триозофосфата, которые получаются таким образом, затем используется для регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата, как показано на рис. 17.5.

Небольшие количества «дополнительного» глицеральдегид-3-фосфата могут быть немедленно использованы в качестве источника энергии, но весь остальной глицеральдегид-3-фосфат превращается в сахарозу для транспорта или запасается в хлоропластах в виде крахмала. В последнем случае он конденсируется в стромах с дигидроксиацетонфосфатом, образуя фруктозо-1,6-бисфосфат, предшественник крахмала. В других ситуациях глицеральдегид-3-фосфат превращается в дигидроксиацетонфосфат, который покидает хлоропласт через специфический транспортер и может с высвобождением энергии расщепляться в процессе гликолиза в цитозоле или использоваться для образования фруктозо-6-фосфата и, следовательно, сахарозы для транспорта к растущим органам растения. В развивающихся листьях значительная доля триозофосфата может расщепляться в гликолизе, высвобождая энергию.

Лекция 18. Фотодыхание. C₄- и САМ-пути

Фотодыхание

В фотосинтезирующих клетках в световых реакциях образуется O₂ (из H₂O), а в светонезависимых реакциях потребляется CO₂, поэтому при фотосинтезе происходит изменение газового состава окружающей среды – поглощение CO₂ и высвобождение O₂.

В темноте растения осуществляют также **митохондриальное дыхание** – окисление субстратов до CO₂ и восстановление O₂ до H₂O. Однако у растений происходит и другой процесс, при котором, как и при митохондриальном дыхании, потребляется O₂ и выделяется CO₂, и который, как фотосинтез, управляется светом. Этот процесс **фотодыхания** – дорогостоящая реакция фотосинтеза по причине недостаточной специфичности фермента рубиско.

Рубиско не имеет абсолютной специфичности в отношении CO₂ как субстрата. Молекулярный кислород (O₂) конкурирует с CO₂ за активный центр, и через каждые три-четыре оборота рубиско катализирует одну конденсацию O₂ с рибулозо-1,5-бисфосфатом с образованием 3-фосфоглицерата и **2-фосфогликолата** (рис. 18.1), метаболически бесполезного продукта. В этом и проявляется оксигеназная активность этого фермента, которая отражена в его полном названии: рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа. В результате реакции с O₂ не происходит фиксации углерода, и в итоге такая реакция оказывается обузой для клетки. Усвоение атомов углерода из 2-фосфогликолата требует от клетки много энергии и высвобождает некоторое количество ранее фиксированного углекислого газа.



Рис. 18.1. Оксигеназная активность рубиско

Гликолатный путь осуществляет превращение двух молекул 2-фосфогликолата в молекулу серина (3 атома углерода) и молекулу CO₂ (рис. 18.2). В хлоропласте фосфатаза переводит 2-фосфогликолат в гликолат, который экспортируется в пероксисому. Там гликолат окисляется молекулярным кислородом, и получившийся альдегид (глиоксилат) подвергается трансаминированию с образованием глицина. В качестве побочного продукта реакции окисления гликолата образуется пероксид водорода, который распадается под действием пероксидазы пероксисомы.

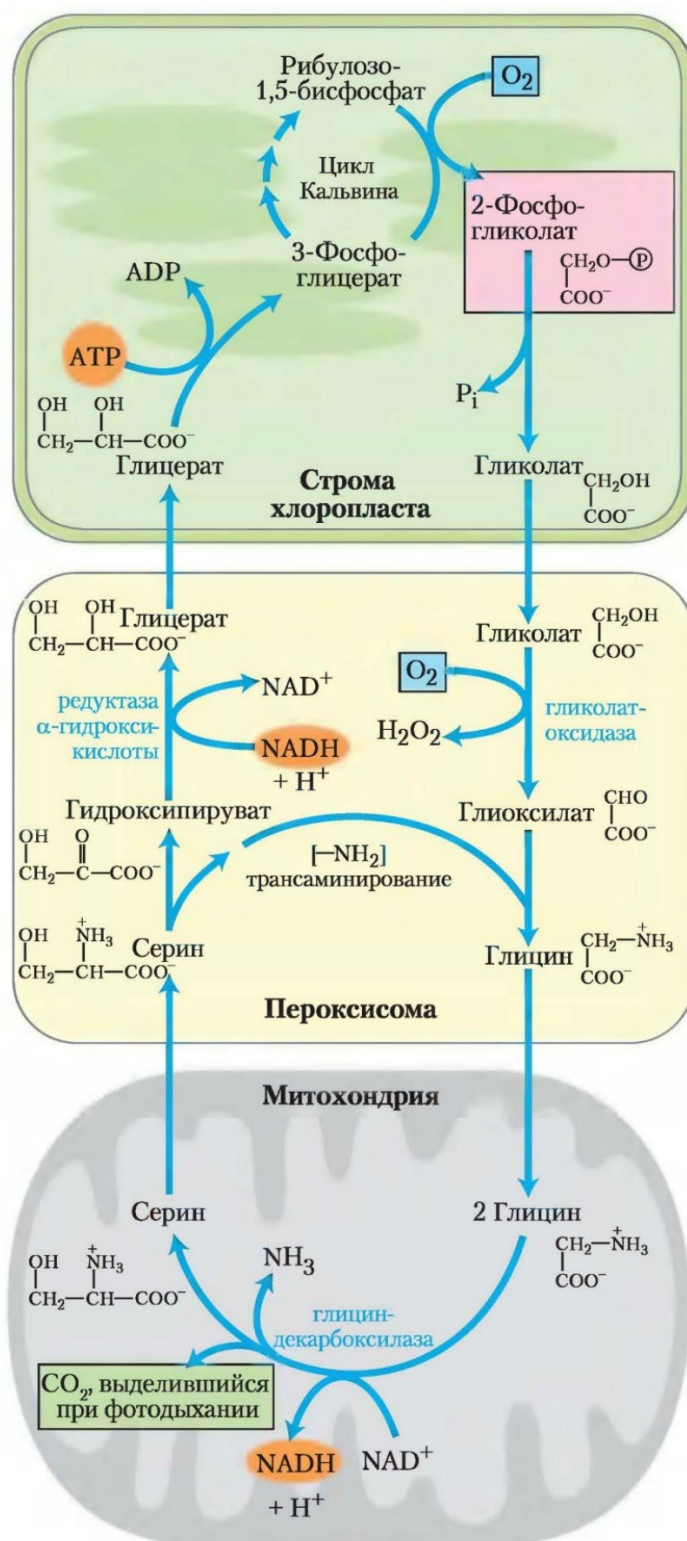


Рис. 18.2. Гликолатный путь

Глицин транспортируется из пероксисомы в митохондрию, где подвергается окислительному декарбоксилированию под действием глициндекарбоксилазного

комплекса. Этот фермент похож по структуре и механизму действия на митохондриальные ферменты, с которыми мы уже сталкивались: пируватдегидрогеназный и α -кетоглутаратдегидрогеназный комплексы. **Глициндекарбоксилазный комплекс** окисляет глицин до CO_2 и NH_3 с одновременным восстановлением NAD^+ до NADH и переносом оставшегося атома углерода от глицина на кофактор тетрагидрофолат. Получившаяся одноуглеродная единица затем переносится серин-гидроксиметилтрансферазой, синтезирующей серин, с тетрагидрофолата на второй глицин. Итоговая реакция, катализируемая глициндекарбоксилазным комплексом и серин-гидроксиметилтрансферазой:



Затем серин превращается в гидроксипируват, далее в глицерат и в конце концов в 3-фосфоглицерат, который используется для регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата, завершая этот длинный «дорогой» цикл (рис. 18.2).

На ярком солнечном свете утечка через гликолатный путь может быть очень высокой. Растение производит таким способом в 5 раз больше CO_2 , чем обычно образуется в результате всех окислительных реакций в цикле трикарбоновых кислот. Для обеспечения этого потока митохондрии растений содержат потрясающе огромное количество глициндекарбоксилазного комплекса: в листьях гороха и шпината четыре белка этого комплекса составляют половину всех белков митохондриального матрикса. В нефотосинтезирующих частях растения, таких как картофельные клубни, митохондрии содержат глициндекарбоксилазный комплекс в очень низкой концентрации.

Совместная активность рубиско-оксигеназы и гликолатного пути потребляет O_2 и производит CO_2 – откуда и название **фотодыхание**. Возможно, этот путь лучше назвать **цикл фотосинтетического окисления углерода** или **C2-путь**. Эти названия не вызывают ассоциации с дыханием в митохондрии. В отличие от митохондриального дыхания фотодыхание не сохраняет энергию и может ингибировать образование чистой биомассы почти на 50%. Эта неэффективность ведет к эволюционным адаптациям, особенно у растений, которые развиваются в теплом климате.

C4-путь, или путь Хэтча-Слэка

У многих растений, которые растут в тропиках, а также теплолюбивых культур, происходящих из тропиков, таких как кукуруза, сахарный тростник и сорго, развился механизм, благодаря которому они избегают проблемы невыгодного фотодыхания. Стадии включения CO_2 в трёхуглеродный 3-фосфоглицерат предшествует несколько стадий, в том числе временная фиксация CO_2 в четырёхуглеродное соединение. Растения, использующие этот путь, называются **C4-растениями**, а сам процесс ассимиляции – **C4-метаболизмом**, или **C4-путём**. Растения, которые фиксируют CO_2 по пути, где на первой стадии происходит реакция конденсации CO_2 с рибулозо-1,5-бисфосфатом с образованием 3-фосфоглицерата, называются **C3-растениями**.

C₄-Растения обычно развиваются при большой интенсивности света и высокой температуре. Их отличает несколько важных характеристик: высокая скорость фотосинтеза, большая скорость роста, низкий уровень фотодыхания, малая скорость потери влаги и специализированная структура листа. В листьях C₄-растений в фотосинтезе участвуют два типа клеток: мезофилл и клетки обкладки (рис. 18.3).

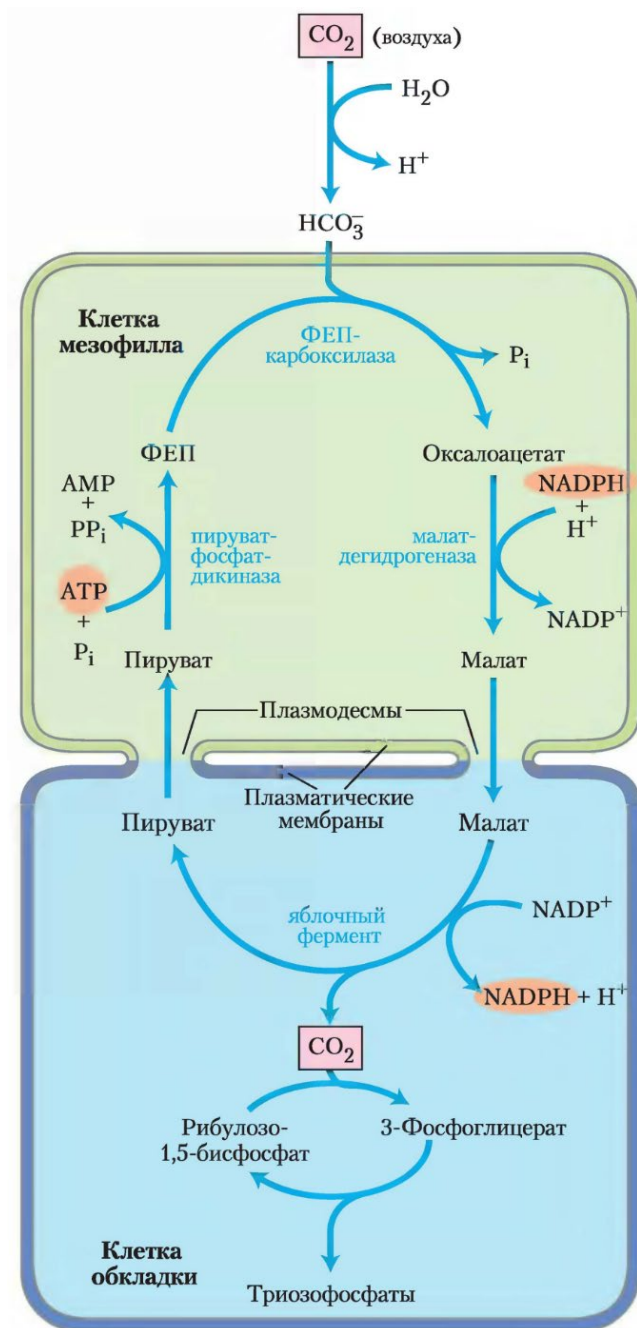


Рис. 18.3. Ассимиляция углерода C₄-растениями

У тропических растений первый интермедиат, в который включается CO_2 – четырёхуглеродное соединение оксалоацетат. Эта реакция происходит в цитозоле клеток мезофилла листьев и катализируется **фосфоенолпируваткарбоксилазой** (анаэроботическая реакция №3), субстратом для которой служит HCO_3^- , а не CO_2 . Затем оксалоацетат восстанавливается до малата с расходом NADPH .

Малат, синтезированный в клетках мезофилла, проникает в соседние клетки обкладки через плазмодесмы – образованные белками каналы, которые соединяют две растительные клетки и осуществляют движение метаболитов и даже малых белков между клетками.

В клетках обкладки малат окисляется и декарбоксилируется с образованием пирувата и CO_2 под действием **NADP-зависимой декарбоксилирующей малатдегидрогеназы** (иногда называемой **малик-ферментом**, или **яблочным ферментом**) с восстановлением NADP^+ (анаэроботическая реакция №4). Молекула CO_2 , высвобождающаяся в клетках обкладки – это та же самая молекула CO_2 , которая изначально находилась в оксалоацетате в клетках мезофилла. Эта молекула CO_2 снова фиксируется (теперь с помощью рубиско) в той же самой реакции, которая происходит в C_3 -растениях: происходит включение CO_2 в положение С-1 молекулы 3-фосфоглицерата.

Пируват, образовавшийся при декарбоксилировании малата в клетках обкладки, транспортируется обратно, в клетки мезофилла, где превращается в фосфоенолпируват в необычной реакции, катализируемой **пируват-фосфатдикиназой** (рис. 18.3). Этот фермент называется дикиназой, потому что он, используя одну молекулу АТФ, одновременно фосфорилирует две разные молекулы: пируват до фосфоенолпирувата и фосфат до пирогосфата. Впоследствии пирогосфат гидролизуется до фосфата, поэтому получается, что для регенерации фосфоенолпирувата используются две высокоэнергетические фосфатные группы АТФ. Теперь этот фосфоенолпируват готов для включения следующей молекулы CO_2 в клетки мезофилла.

ФЕП-карбоксилаза имеет высокое сродство к HCO_3^- (который в водном окружении образуется из CO_2) и фиксирует CO_2 более эффективно, чем рубиско. В отличие от рубиско этот фермент не использует O_2 в качестве альтернативного субстрата, поэтому в этой реакции нет конкуренции между CO_2 и O_2 . Таким образом, ФЕП-карбоксилазная реакция служит для фиксации CO_2 в форме малата. Высвобождением CO_2 из малата в клетках обкладки достигается высокая локальная концентрация углекислого газа для функционирования рубиско с почти максимальной скоростью и подавления её оксигеназной активности.

В клетках обкладки CO_2 включается в 3-фосфоглицерат, поэтому другие реакции цикла Кальвина происходят так, как было описано ранее. Таким образом, у C_4 -растений клетки мезофилла осуществляют ассимиляцию CO_2 по C_4 -пути, а клетки обкладки синтезируют крахмал и сахарозу по C_3 -пути.

У C_4 -растений путь ассимиляции CO_2 энергетически более дорогой, чем у C_3 -растений. На каждую молекулу CO_2 , ассимилированную в C_4 -пути, должна регенерироваться молекула ФЕП с затратой двух высокоэнергетических фосфатных групп АТФ. Таким образом, C_4 -растениям необходимо пять молекул АТФ на ассимиляцию одной молекулы CO_2 , в то время как C_3 -растениям надо только три молекулы АТФ (девять АТФ на один триозофосфат). Однако при увеличении температуры (и уменьшении сродства рубиско к CO_2) достигаются условия (около 28-30 °С), при которых выгода устранения фотодыхания значительно превосходит энергетические траты.

САМ-путь

Суккулентные растения, такие как кактусы и ананас, которые в природе произрастают в очень жарком и очень засушливом климате, осуществляют другой вариант фотосинтетической фиксации CO_2 , уменьшающий потери воды через устьица, через которые CO_2 и O_2 должны попадать в ткань листа.

Вместо пространственного разделения процессов начального захвата CO_2 и его фиксации рубиско (как это делают C_4 -растения) они разобщают эти процессы во времени. Ночью, когда воздух холоднее и более влажный, устьица открыты и пропускают CO_2 , который затем фиксируется на оксалоацетате ФЕП-карбоксилазой. Оксалоацетат восстанавливается до малата и запасается в вакуолях с целью защиты ферментов цитозоля и пластид от низких значений рН, возникающих из-за диссоциации яблочной кислоты. В дневное время устьица закрыты, что предотвращает потерю воды, которая происходила бы из-за высоких дневных температур, и углерод, включённый ночью в малат, высвобождается NADP-зависимой малатдегидрогеназой в виде CO_2 . Этот CO_2 далее вовлекается ферментом рубиско в цикл Кальвина. Так как этот метод фиксации CO_2 впервые был открыт в многолетних толстянковых растениях из семейства *Crassulaceae*, он был назван *crassulacean acid metabolism* (САМ-метаболизм), а соответствующие растения названы **САМ-растениями**.

Лекция 19. Метаболизм пуринов

Катаболизм пуринов

Пуриновые нуклеотиды разрушаются по пути, в котором они теряют свои фосфаты под действием **5'-нуклеотидазы** (рис. 19.1). Аденилат превращается в аденозин, который дезаминируется с образованием инозина под действием **аденозиндезаминазы**, а инозин гидролизует до гипоксантина (своего пуринового основания) и D-рибозы. Гипоксантин последовательно окисляется до ксантина, а затем до мочевой кислоты под действием **ксантиноксидазы** – флавосодержащего фермента с атомом молибдена и четырьмя железосерными центрами в качестве простетических групп. Акцептором электронов в этой сложной реакции служит молекулярный кислород.

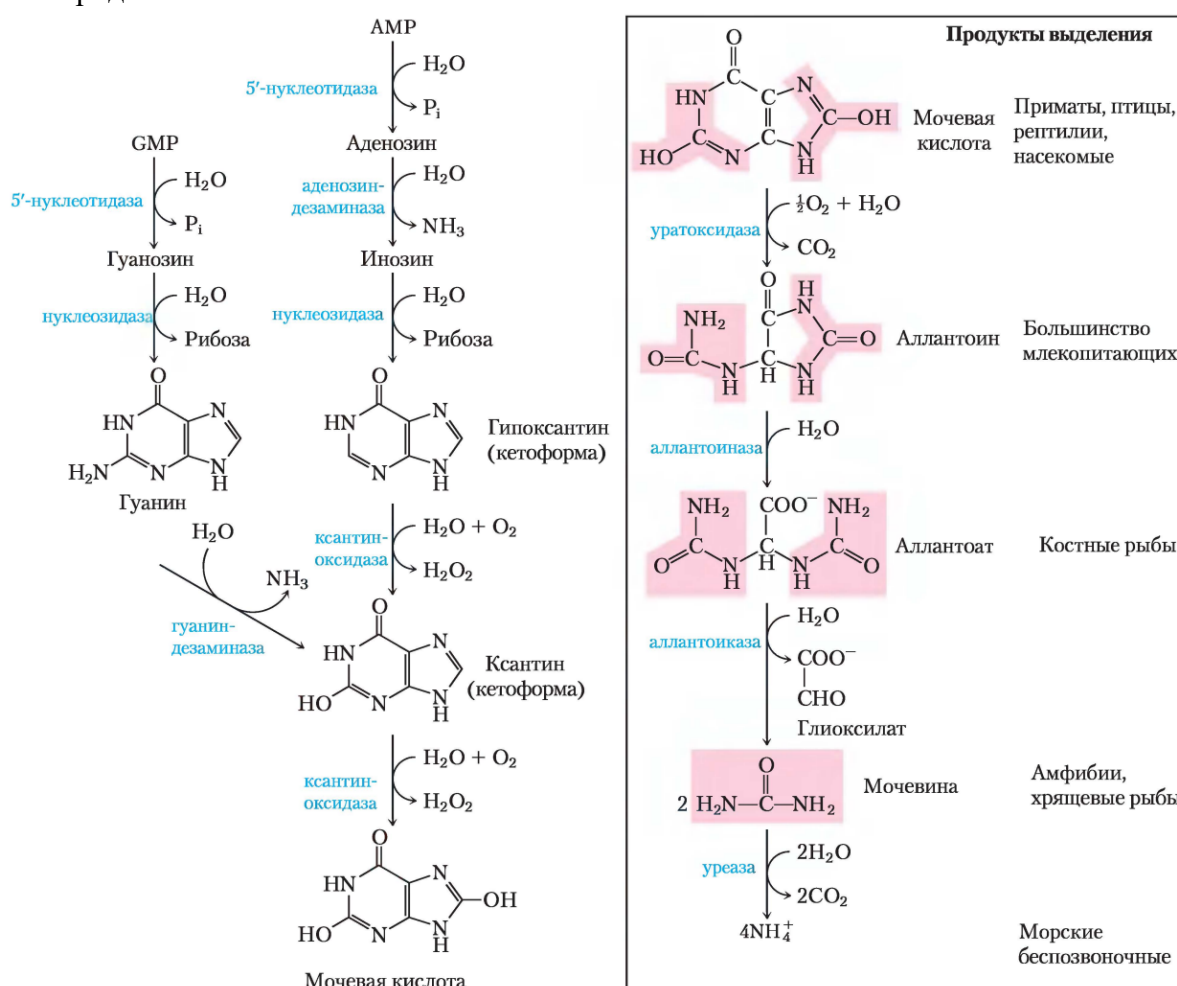


Рис. 19.1. Катаболизм пуриновых нуклеотидов

Катаболизм GMP также может идти с образованием мочевой кислоты в качестве конечного продукта. GMP сначала гидролизует до гуанозина, который потом расщепляется с образованием свободного гуанина. От гуанина гидролитически

удаляется аминогруппа с образованием ксантина, который затем превращается в мочевую кислоту при действии ксантиноксидазы (рис. 19.1).

Мочевая кислота – конечный экскретируемый продукт пуринового катаболизма приматов, птиц и некоторых других животных. У здорового взрослого человека мочевая кислота выделяется со скоростью около 0,6 грамм в сутки. Часть выделяемого организмом продукта образуется из всасываемых в желудке пуринов, а часть – из пуриновых оснований нуклеиновых кислот. У большинства млекопитающих и других позвоночных мочевая кислота в дальнейшем разрушается до **аллantoина** под действием **уратоксидазы**. У других организмов этот путь продолжается дальше, как показано на рис. 19.1. У рыб азот выводится главным образом как NH_4^+ , а не как мочевина.

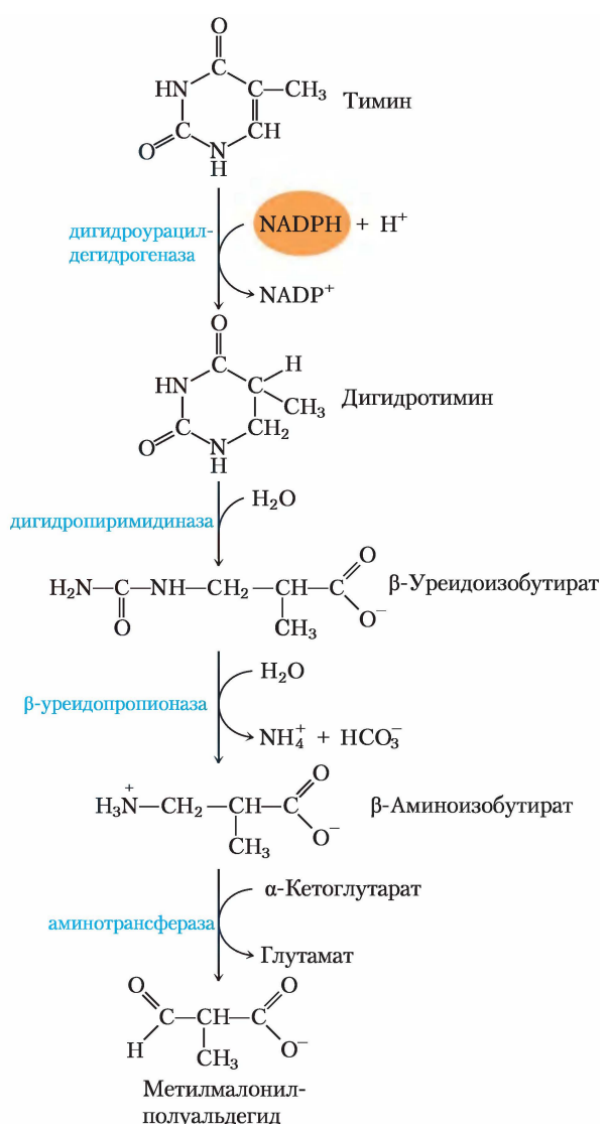


Рис. 19.2. Пути деградации тимина

Пути распада пиримидинов главным образом ведут к NH_4^+ , а значит, к мочеvine. Тимин, например, деградирует до метилмалонилполуальдегида (рис. 19.2) – интермедиата катаболизма валина. Дальше он распадается через пропионил-СоА и метилмалонил-СоА до сукцинил-СоА.

Растворимость мочевой кислоты

Подагра – это болезнь суставов, вызванная повышенным содержанием мочевой кислоты в крови и тканях. При воспалении суставов человек испытывает сильную боль, а из-за отложения кристаллов урата натрия могут проявляться симптомы артрита.

Повреждаются также почки, ведь избыток мочевой кислоты накапливается и в почечных канальцах. Обычно подагра развивается у мужчин. Причины болезни до конца неизвестны, но она часто сопровождается недостаточным выделением уратов. В некоторых случаях причиной может быть также генетическое нарушение в том или ином ферменте пуринового метаболизма.

Для эффективного лечения подагры назначают соблюдение определенной диеты в комбинации с лекарственной терапией. Пища, особенно богатая нуклеотидами и нуклеиновыми кислотами, такая как печень или железы, должна быть исключена из рациона. Облегчение симптомов достигается при приеме лекарства аллопуринола, которое ингибирует ксантиноксидазу – фермент, катализирующий превращение пуринов в мочевую кислоту. **Аллопуринол** – субстрат ксантиноксидазы, под действием которой он превращается в гидроксипуринол (аллоксантин). Гидроксипуринол инактивирует восстановленную форму фермента, оставаясь прочно связанным с его активным центром. При ингибировании ксантиноксидазы выделяются продукты пуринового метаболизма: ксантин и гипоксантин, которые более растворимы, чем мочевая кислота и менее склонны к образованию кристаллических отложений.

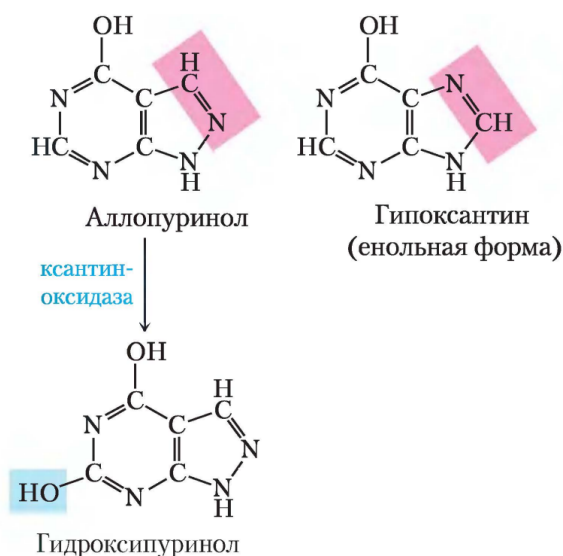


Рис. 19.3. Аллопуринол, ингибитор ксантиноксидазы

Растворимость мочевой кислоты – 0,5 мг/л, гипоксантина – 1,5 мг/л, ксантина – 0,1 мг/л. Терапевтический эффект связан с тем, что все излишки можно вывести из организма в виде гипоксантина при достаточном употреблении воды. Иногда бывают осложнения, связанные с образованиями камней других типов, растворимость которых ещё меньше (например, из ксантина). Но это не так страшно, поскольку GMP гораздо меньше, чем AMP, и существенного вклада он не даст. Свободных нуклеотидов в организме в целом очень мало, большинство их них находятся в составе нуклеиновых кислот.

Реутилизация пуринов

Получение нуклеотидов может идти двумя путями: синтез *de novo* и путь реутилизации. При реутилизации повторно используются свободные основания и нуклеотиды, образованные при распаде нуклеиновых кислот. Оба пути биосинтеза важны для клеточного метаболизма.

Свободные пуриновые и пиримидиновые основания постоянно высвобождаются в клетке в процессе катаболизма нуклеотидов. Основные количества свободных пуринов остаются и повторно используются для синтеза нуклеотидов в пути, намного более простом и быстром, чем синтез пуриновых нуклеотидов *de novo*. Один из самых простых путей реутилизации нуклеотидов состоит из одной-единственной реакции, катализируемой аденозинфосфорибозилтрансферазой, в которой свободный аденин взаимодействует с PRPP с образованием соответствующего аденинового нуклеотида:



Свободный гуанин и гипоксантин (продукт дезаминирования аденина; рис. 19.1) реутилизуются в похожем пути под действием гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы. Аналогичный путь «спасения» существует и для пиримидиновых оснований у микроорганизмов, и, возможно, у млекопитающих.

Синтез пуринов *de novo*

Вероятно, синтез пуринов и пиримидинов *de novo* практически одинаков у всех живых организмов. Две особенности синтеза нуклеотидов заслуживают внимания. Во-первых, ферменты в клетках представлены большими полиферментными комплексами, особенно те, которые участвуют в синтезе пуринов *de novo*. Во-вторых, клеточный пул нуклеотидов (всех, кроме АТФ) довольно невелик и составляет, вероятно, ~1% или менее нужного количества для синтеза клеточной ДНК. Поэтому клетки должны продолжать синтезировать нуклеотиды и во время образования нуклеиновых кислот, а в некоторых случаях синтез нуклеотидов может лимитировать скорость репликации ДНК и транскрипции. Из-за важности этих биологических процессов для делящейся клетки препараты, ингибирующие синтез нуклеотидов, получили заслуженное признание в современной медицине.

Синтез нуклеотидов *de novo* начинается с их метаболических предшественников: аминокислот, рибозо-5-фосфата, CO_2 и NH_3 .

Два основных пуриновых нуклеотида, входящих в состав нуклеиновых кислот – это аденозин-5'-монофосфат (АМР, аденилат) и гуанозин-5'-монофосфат (ГМР, гуанилат) содержат пуриновые основания аденин и гуанин. На рис. 19.4 показано происхождение атомов углерода и азота в пуриновом кольце.

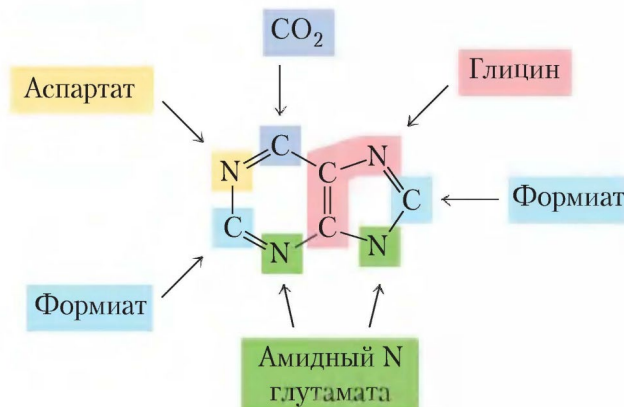


Рис. 19.4. Происхождение атомов пуринового кольца

Некоторые важные предшественники участвуют в синтезе *de novo* и пуринов, и пиримидинов. **Фосфорибозилпирофосфат (PRPP)** играет важную роль в синтезе и тех, и других. Он образуется из рибозо-5-фосфата (продукт ПФП) путём его активации за счёт АТФ и соответствующей киназы (она ингибируется многими продуктами данного синтетического пути – в первую очередь нуклеотидами).

Примечательно, что гуанин, аденин, тимин, цитидин и урацил не являются интермедиатами этого пути, то есть не происходит синтез, а затем присоединение оснований к рибозе, как это можно было бы ожидать. Пуриновое кольцо «строится» непосредственно присоединением к рибозе одного или нескольких атомов один раз за весь цикл биосинтеза. Свободные основания не участвуют в синтезе *de novo*, они появляются как интермедиаты в некоторых путях реутилизации.

Этапы синтеза пуриновых нуклеотидов, представленные на рис. 19.5:

- ① Аминогруппа от глутамата присоединяется к С-1 атому PRPP. Образованный 5-фосфорибозиламин очень неустойчив, при рН 7,5 время полураспада 30 секунд. Затем на этой структуре достраивается пуриновое кольцо. Описанный здесь путь у всех организмов одинаков, кроме одной стадии, которая отличается у высших эукариот, как будет показано далее.
- ② Присоединение трех атомов глицина. В этой реакции конденсации на активацию карбоксильной группы глицина (в виде ацилфосфата) тратится АТФ.
- ③ К аминогруппе глицина от N^{10} -формилтетрагидрофолата добавляется формил,
- ④ К аминогруппе глицина от глутамата добавляется атом азота.

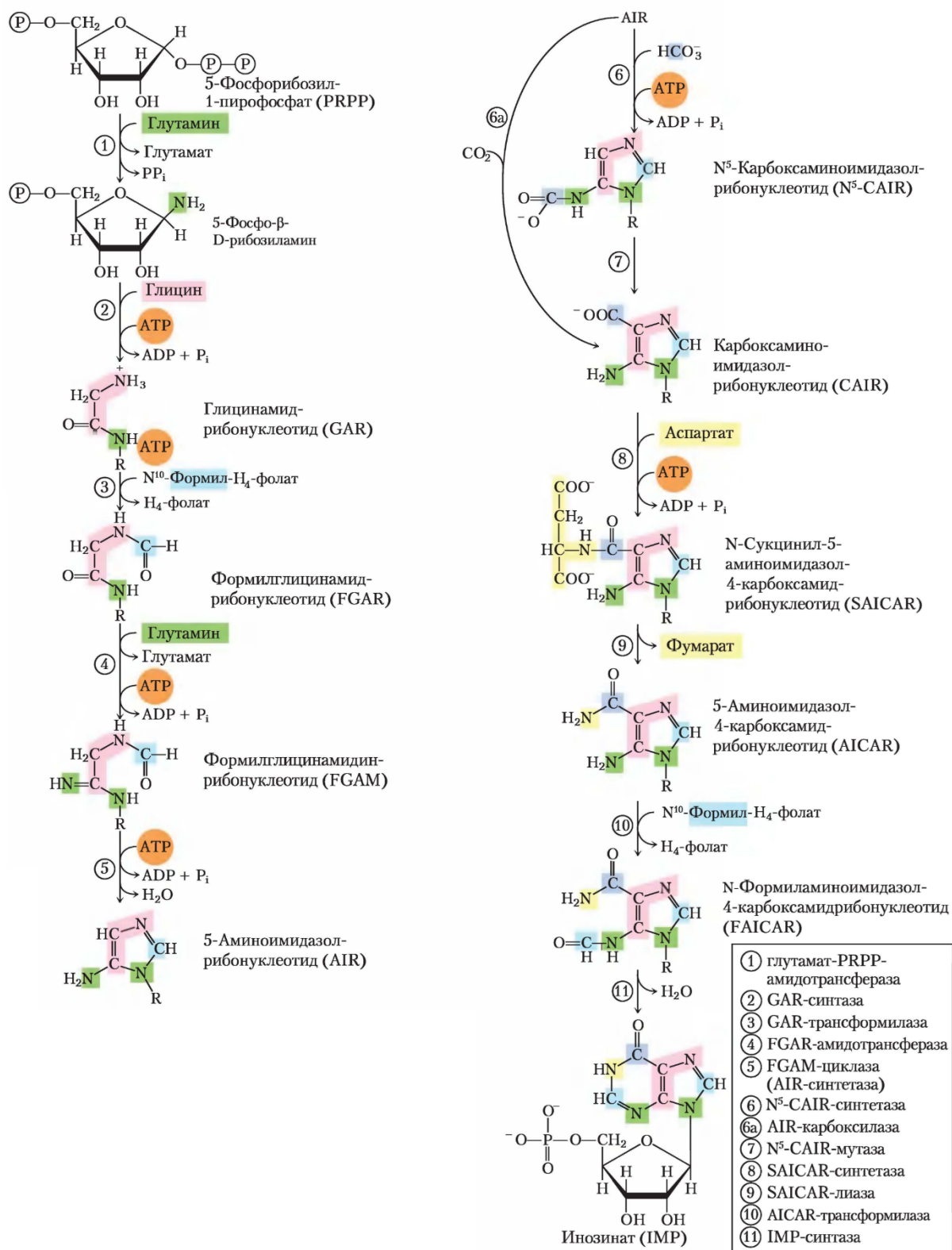


Рис. 19.5. Синтез пуриновых нуклеотидов *de novo*: образование пуринового кольца IMP

- ⑤ Реакция дегидратации и замыкание цикла, ведущее к образованию пятичленного имидазольного кольца пуринового ядра. На этой стадии три из шести атомов, необходимых для построения второго кольца в пуриновой структуре, уже на своем месте. Получается 5-аминоимидазолрибонуклеотид (AIR).
- ⑥ Для того чтобы закончить этот процесс, сначала присоединяется карбоксильная группа. Это карбоксилирование несколько необычно, так как в реакции используется не биотин, а гидрокарбонат, присутствующий в водном окружении в достаточном количестве.
- ⑦ При перегруппировке карбоксилат с внециклической аминогруппы переносится на четвертый атом имидазольного кольца.
- Стадии ⑥ и ⑦ есть у бактерий и грибов. У высших эукариот, и у человека в том числе, 5-аминоимидазолнуклеотид, образованный на стадии ⑤, карбоксилируется непосредственно с образованием карбоксиаминоимидазолрибонуклеотида в одну, а не в две стадии (стадия ба). Фермент, катализирующий эту реакцию, называется карбоксилазой аминоксимидазолрибонуклеотида (AIR-карбоксилаза).
- ⑧-⑨ Аспартат служит донором аминогрупп: происходит образование амидной связи, которое сопровождается удалением углеродного скелета аспартата (в виде фумарата).
- ⑩ Последний атом углерода поступает от N¹⁰-формилтетрагидрофолата.
- ⑪ Замыкание второго цикла приводит к образованию второго смежного кольца пуринового ядра. Так образуется первый интермедиат инозинат (IMP) с полностью готовым пуриновым кольцом.

Ферменты, участвующие в синтезе IMP, организованы в клетке в огромный мультиферментный комплекс. Это подтверждается существованием отдельных полипептидов с несколькими функциями, в том числе они катализируют непоследовательные стадии данного пути. В эукариотических клетках, от дрожжей до плодовых мушек и кур, стадии ①, ③ и ⑤ (рис. 19.5) катализируются многофункциональным белком. Вдобавок многофункциональный белок катализирует стадии ⑩ и ⑪. У человека многофункциональный фермент совмещает активности AIR-синтазы и SAICAR-синтазы (стадии ба и ⑧). У бактерий эти активности представлены разными белками, но в их клетках может существовать огромный нековалентно связанный комплекс. Туннелирование интермедиатов реакций от одного фермента к другому, которое возможно благодаря существованию такого комплекса, вероятно, имеет особенно важное значение для неустойчивых интермедиатов, например, для 5-фосфорибозиламина.

Для превращения инозината в аденилат необходимо внедрение аминогруппы, полученной от аспартата (рис. 19.6). Это осуществляется в две стадии, похожие на те, что происходят при включении атома N-1 в пуриновое кольцо (рис. 19.5, стадии ⑧ и ⑨). Главное отличие в том, что для синтеза аденозилсукцината как источник

высокоэнергетического фосфата используется GTP, а не АТФ. Гуанилат образуется при NAD^+ -зависимом окислении инозината, сопровождающимся добавлением аминогруппы, взятой с глутамина. На финальной стадии АТФ расщепляется на АМР и PP_i (рис. 19.6).

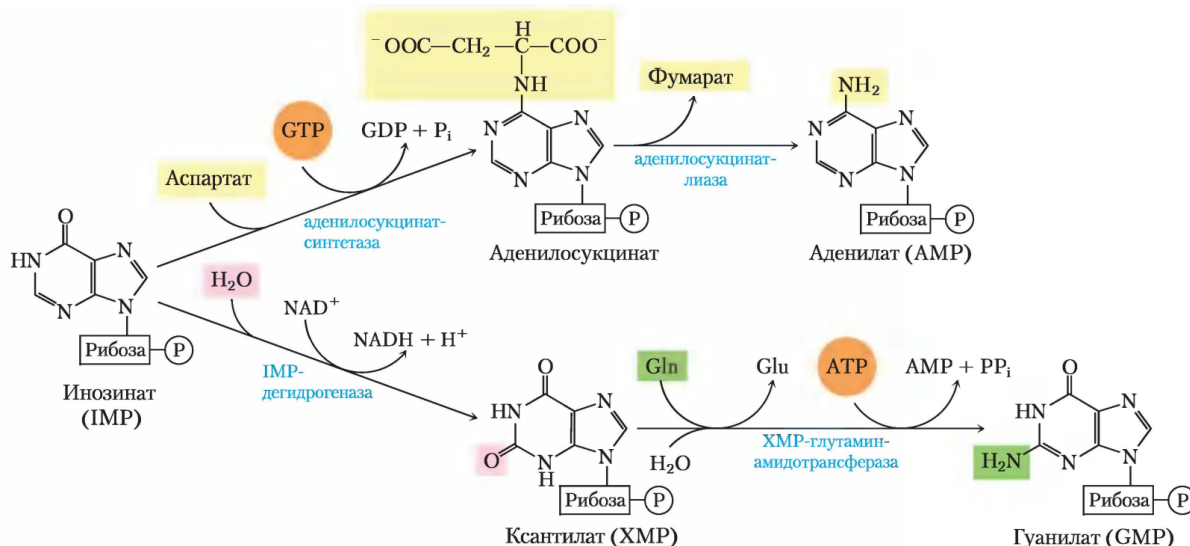


Рис. 19.6. Биосинтез АМР и GMP из IMP.

Регуляция биосинтеза пуриновых нуклеотидов

При регуляции общей скорости синтеза пуриновых нуклеотидов *de novo* и отношения скоростей образования двух конечных продуктов аденилата и гуанилата совместно действуют три главных управляющих механизма (рис. 19.7).

Первый механизм регулирует первую реакцию, которая уникальна для синтеза пуринов – перенос аминогруппы на PRPP с образованием 5-фосфорибозиламина. Эта реакция катализируется аллостерическим ферментом глутамин-PRPP-амидотрансферазой, которая ингибируется конечными продуктами IMP, АМР и GMP. В этом согласованном ингибировании АМР и GMP действуют совместно, усиливая эффект друг друга. Таким образом, какой бы продукт ни накапливался в избытке, АМР или GMP, первая стадия биосинтеза из PRPP всегда будет частично ингибироваться.

Второй контролирующий механизм, приводимый в действие на более поздней стадии, основан на том, что избыток GMP в клетке ингибирует образование ксантилата из инозината под действием IMP-дегидрогеназы без влияния на образование АМР (рис. 19.7). И наоборот, накопление аденилата ингибирует синтез аденозилсукцината аденозилсукцинатсинтетазой без воздействия на образование GMP.

Третий механизм регуляции основан на том, что при превращении IMP в АМР необходим GTP (рис. 19.6), в то время как при превращении IMP в GMP требуется АТФ. Взаиморегуляция этих двух процессов поддерживает необходимый баланс при синтезе двух рибонуклеотидов.

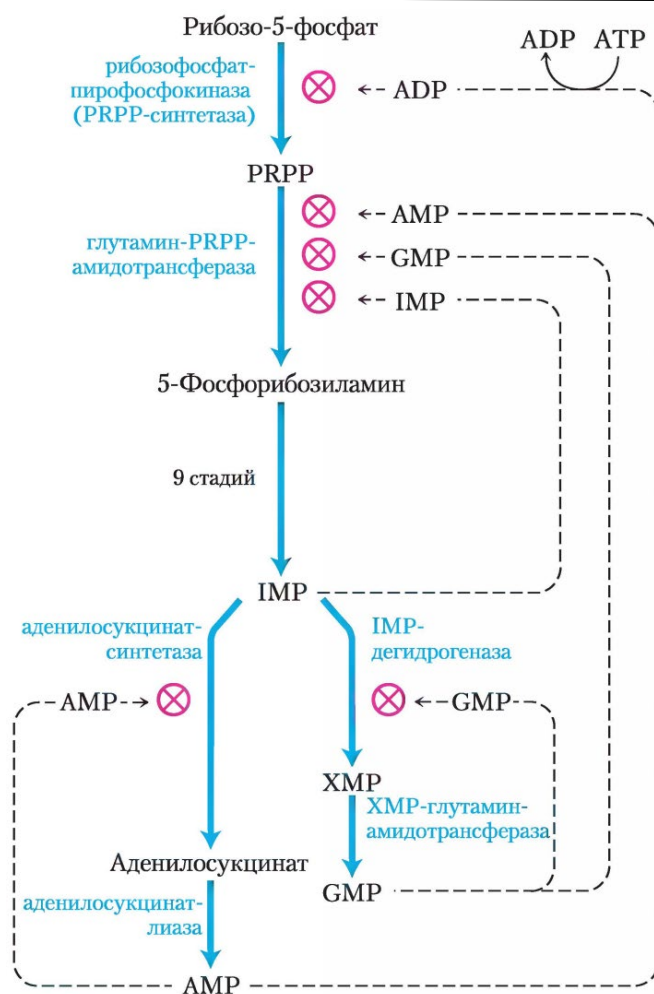


Рис. 19.7. Регуляция биосинтеза адениновых и гуаниновых нуклеотидов у *E.coli*.

Последний механизм контроля – это ингибирование синтеза PRPP аллостерической регуляцией рибозофосфатпирофосфокиназы. Этот фермент, помимо метаболитов других путей, которые начинаются с PRPP, ингибируется ещё ADP и GDP.

Лекция 20. Метаболизм пиримидинов

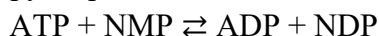
Синтез трифосфатов

В биосинтезе нуклеотиды обычно превращаются в нуклеозидтрифосфаты по путям, одинаковым для всех клеток. Фосфорилирование AMP до ADP осуществляется **аденилаткиназой** по реакции:



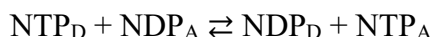
Образованный ADP фосфорилируется до ATP гликолитическими ферментами в процессе окислительного фосфорилирования.

ATP также участвует в образовании других нуклеозиддифосфатов под действием ферментов **нуклеозидмонофосфаткиназ**. Этот класс ферментов специфичен в основном в отношении конкретного основания, но не специфичен по сахарам (рибоза или дезоксирибоза) и катализируют реакцию:



Эффективные системы рефосфорилирования ADP до ATP в клетке сдвигают равновесие этой реакции в сторону образования продуктов.

Нуклеозиддифосфаты превращаются в трифосфаты под действием распространённого фермента **нуклеозиддифосфаткиназы**, которая катализирует реакцию:



Этот фермент необычен тем, что он неспецифичен ни по основанию (пурин или пиримидин), ни по сахару (рибоза или дезоксирибоза). Такое отсутствие специфичности относится и к акцептору фосфата (A) и к его донору (D), хотя донором (NTP_D) обычно постоянно оказывается ATP, так как в аэробных условиях его в клетке в намного больше, чем других нуклеозидтрифосфатов.

Синтез пиримидинов

К обычным пиримидиновым нуклеотидам относятся цитидин-5'-монофосфат (CMP – цитидилат) и уридин-5'-монофосфат (UMP – уридилат), которые содержат пиримидины цитозин и урацил. Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов *de novo* (рис. 20.1) несколько отличается от синтеза пуриновых нуклеотидов. Шестичленное пиримидиновое кольцо сначала присоединяется к рибозо-5-фосфату. Для этой реакции необходим карбамоилфосфат – ещё один интермедиат цикла мочевины (см. рис. 12.9). Однако нужный для цикла мочевины карбамоилфосфат у животных синтезируется карбамоилфосфатсинтетазой I в митохондриях, в то время как карбамоилфосфат, участвующий в биосинтезе пиримидинов, образуется в цитозоле другой формой фермента – **карбамоилфосфатсинтетазой II**. У бактерий поток карбамоилфосфата и для синтеза аргинина, и для синтеза пиримидина обеспечивает один фермент, который имеет три различных активных центра, разделённых каналом. Это яркий пример туннелирования нестабильных интермедиатов реакции между активными центрами.

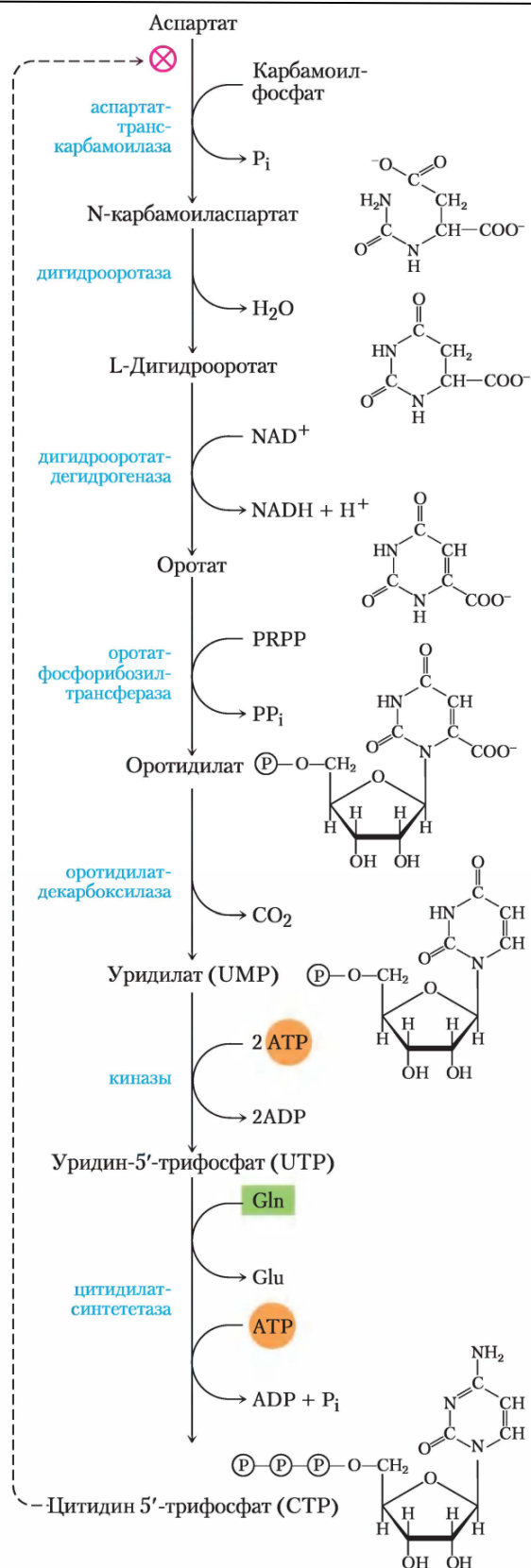


Рис. 20.1. Синтез пиримидиновых нуклеотидов UTP и CTP de novo через оротидилат

В первой реакции, принадлежащей пути биосинтеза пиримидинов, карбамоилфосфат взаимодействует с аспаратом с образованием N-карбамоиласпартата (рис. 20.1). Эта реакция катализируется **аспартаттранскарбамоилазой**. У бактерий эта стадия жёстко регулируется, а бактериальная аспартаттранскарбамоилаза – один из наиболее тщательно изученных аллостерических ферментов. При удалении воды с N-карбамоиласпартата, которое катализирует **дигидрооротаза**, пиримидиновое кольцо замыкается с образованием L-дигидрооротата. Это соединение окисляется до пиримидинового производного оротата в реакции, где NAD^+ служит конечным акцептором электронов. У эукариот первые три фермента этого пути карбамоилфосфатсинтаза II, аспартаттранскарбамоилаза и дигидрооротаза являются частью одного трёхфункционального белка CAD. Этот белок содержит три идентичные полипептидные цепи, каждая из которых несёт активные центры для всех трёх реакций. Отсюда следует, что для этого пути могут быть довольно обычны большие мультиферментные комплексы.

После образования оротата к нему присоединяется боковая цепь рибозо-5-фосфата, которую опять предоставляет PRPP (рис. 20.1). Получаемый при этом оротидилат затем декарбоксилируется до уридилата, который фосфорилируется до UTP. CTP образуется из UTP под действием **цитидилатсинтетазы** через ацилфосфатный интермедиат (с потреблением одной молекулы АТФ). Донором азота обычно служит глутамин, хотя во многих случаях цитидилатсинтетазы могут использовать непосредственно NH_4^+ .

Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов регулируется по механизму отрицательной обратной связи. Регуляция скорости синтеза пиримидиновых нуклеотидов у бактерий происходит главным образом через аспартаттранскарбамоилазу, которая катализирует первую реакцию пути и ингибируется CTP – конечным продуктом этой цепочки реакций (рис. 20.1).

Синтез дезоксирибонуклеотидов

Дезоксирибонуклеотиды, строительные блоки ДНК, образуются из соответствующих рибонуклеотидов непосредственным восстановлением 2'-углеродного атома D-рибозы с образованием 2'-дезоксипроизводного. Например, аденозиндифосфат (ADP) восстанавливается до 2'-дезоксаденозиндифосфата (dADP), а GDP – до dGDP. Эта реакция в некотором смысле необычна, так как перед восстановлением атом углерода не активируется; другие аналогичные реакции пока неизвестны. Реакция катализируется **рибонуклеотидредуктазой**, наиболее охарактеризованной для *E. coli*, её субстраты – рибонуклеозиддифосфаты.

Восстановление некоторых остатков D-рибозы в рибонуклеозиддифосфате до 2'-дезоксид-рибозы происходит с участием двух атомов водорода, которые предоставляет NADPH через промежуточный водород-переносящий белок **тиоредоксин**. Этот распространённый белок выполняет похожую функцию в реакциях окисления-

восстановления при фотосинтезе и других процессах. Тиоредоксин содержит парные группы $-SH$, которые переносят атомы водорода от NADPH на рибонуклеозиддифосфат. Его окисленная (дисульфидная) форма восстанавливается с помощью NADPH в реакции, катализируемой **тиоредоксинредуктазой** (рис. 20.2, б), а затем используется рибонуклеотидредуктазой для восстановления нуклеозиддифосфатов (NDP) до дезоксирибонуклеозиддифосфатов (dNDP). Другой источник восстанавливающих эквивалентов для рибонуклеотидредуктазы – это глутатион (GSH). Глутатион служит восстановителем родственного тиоредоксину белка **глутаредоксина**, который передает восстановительный потенциал далее на рибонуклеотидредуктазу (рис. 20.2, а).

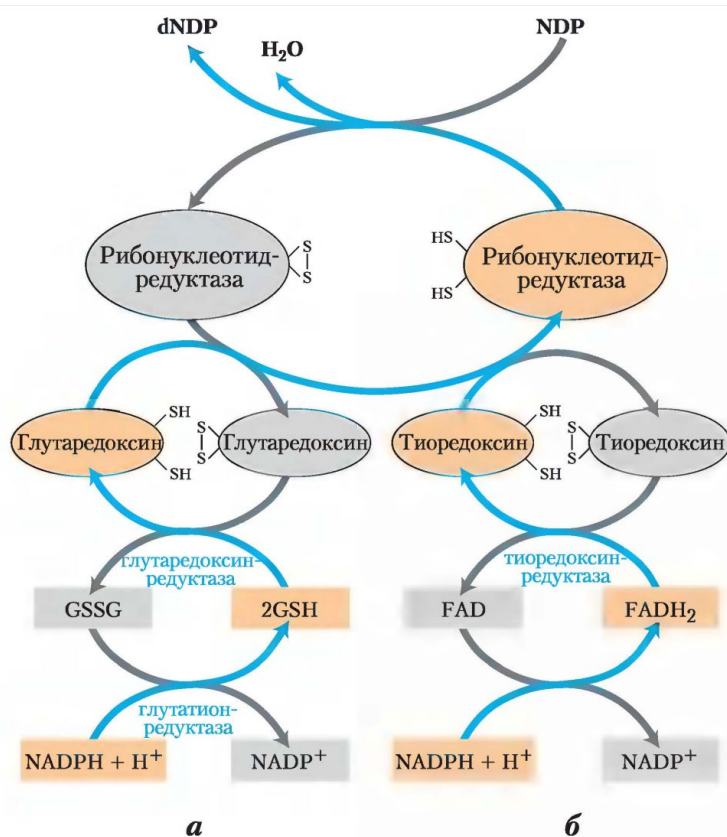


Рис. 20.2. Восстановление рибонуклеотидов до дезоксирибонуклеотидов

Механизм катализа рибонуклеотидредуктазой

Рибонуклеотидредуктаза примечательна тем, что механизм катализа с её участием подробно описан как пример свободнорадикальной реакции в биохимических процессах, что когда-то считалось довольно редким событием в живых системах. Этот фермент у *E. coli* и большинства эукариот представляет собой димер, его субъединицы называются R1 и R2 (рис. 20.3). R1-субъединица содержит два типа регуляторных центров, как будет описано ниже. Два активных центра фермента образуются при взаимодействии R1- и R2-субъединиц. В каждом активном центре две

сульфгидрильные группы, необходимые для активности фермента, принадлежат R1-субъединице, а стабильный радикал тирозина – R2-субъединице. R2-Субъединица также содержит кофактор с двумя ионами железа Fe^{3+} , которые помогают генерировать и стабилизировать радикалы тирозина (рис. 20.3).

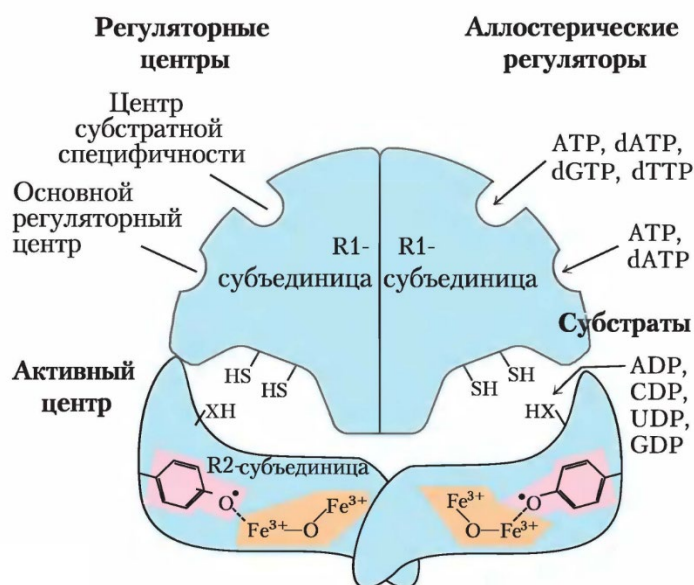


Рис. 20.3. Структура субъединиц рибонуклеотидредуктазы

Радикал тирозина находится слишком далеко от активного центра, чтобы непосредственно с ним взаимодействовать. Но он вызывает в активном центре образование другого радикала, который и функционирует при катализе. Наиболее вероятный механизм рибонуклеотидредуктазной реакции показан на рис. 20.4. У *E. coli* наиболее вероятные источники необходимых восстановительных эквивалентов для этой реакции – это тиоредоксин и глутаредоксин.

Обнаружено три класса рибонуклеотидредуктаз. Механизмы реакций (известные) в основном соответствуют схеме, приведенной на рис. 20.4, различия наблюдаются в природе радикала в активном центре и в природе кофактора, необходимого для его образования. Ферменту *E. coli* (класс I) для «восстановления» «погашенного» радикала тирозина необходим кислород, поэтому этот фермент работает только в аэробных условиях. Ферменты класса II, найденные у других микроорганизмов, содержат 5'-дезоксиаденозилкобаламин вместо двухъядерного железного центра. Ферменты класса III приспособились функционировать в анаэробных условиях. Если *E. coli* растёт анаэробно, она содержит независимый фермент класса III. Этот фермент несёт железосерный кластер (его структура отличается от двухъядерного железного центра ферментов класса I) и использует в работе NADPH и S-аденозилметионин. В качестве субстрата он предпочитает нуклеозидтрифосфаты, а не нуклеозиддифосфаты. Появление рибонуклеотидредуктаз различных классов, необходимых для образования предшественников ДНК в

различных условиях окружающей среды, свидетельствует о важности этой реакции в метаболизме нуклеотидов.

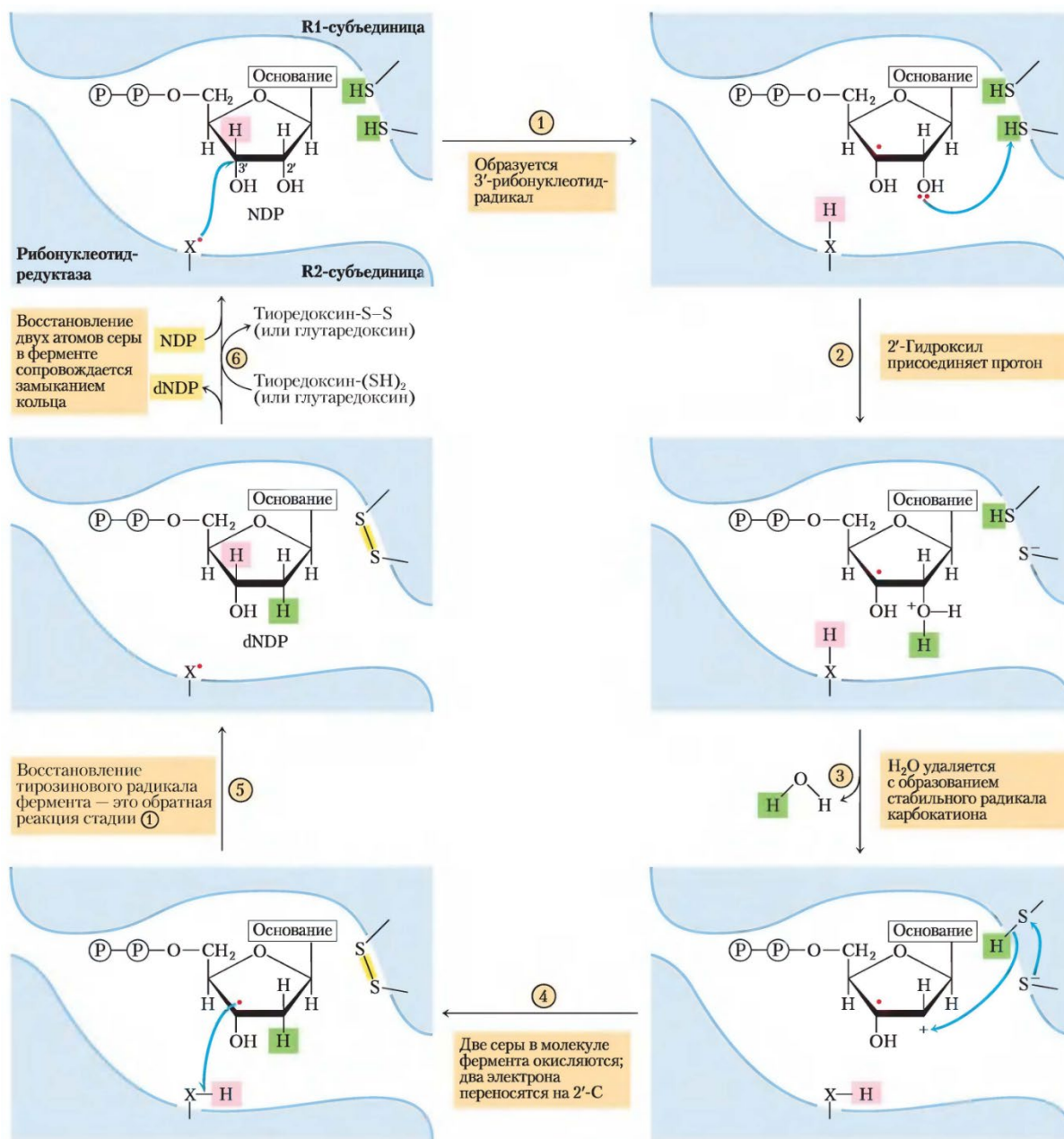


Рис. 20.4. Механизм рибонуклеотидредуктазной реакции

Регуляция рибонуклеотидредуктазы *E. coli* несколько необычна: при связывании эффекторных молекул регулируется не только её активность, но и её субстратная специфичность.

Лекция 21. Катаболизм пиримидинов. Гормоны

Биосинтез тимидилата (dTMP)

ДНК содержит тимин вместо урацила, и в пути синтеза тимина *de novo* участвуют только дезоксирибонуклеотиды. Непосредственным предшественником тимидилата (dTMP) служит dUMP. У бактерий путь, ведущий к dUMP, начинается с образования dUTP, который получается либо при дезаминировании dCTP, либо при фосфорилировании dUDP (рис. 21.1, слева). dUTP превращается в dUMP под действием dUTPазы. Последняя реакция должна быть эффективной, чтобы поддерживать пул dUTP на низком уровне и таким образом предотвращать включение уридилата в ДНК.

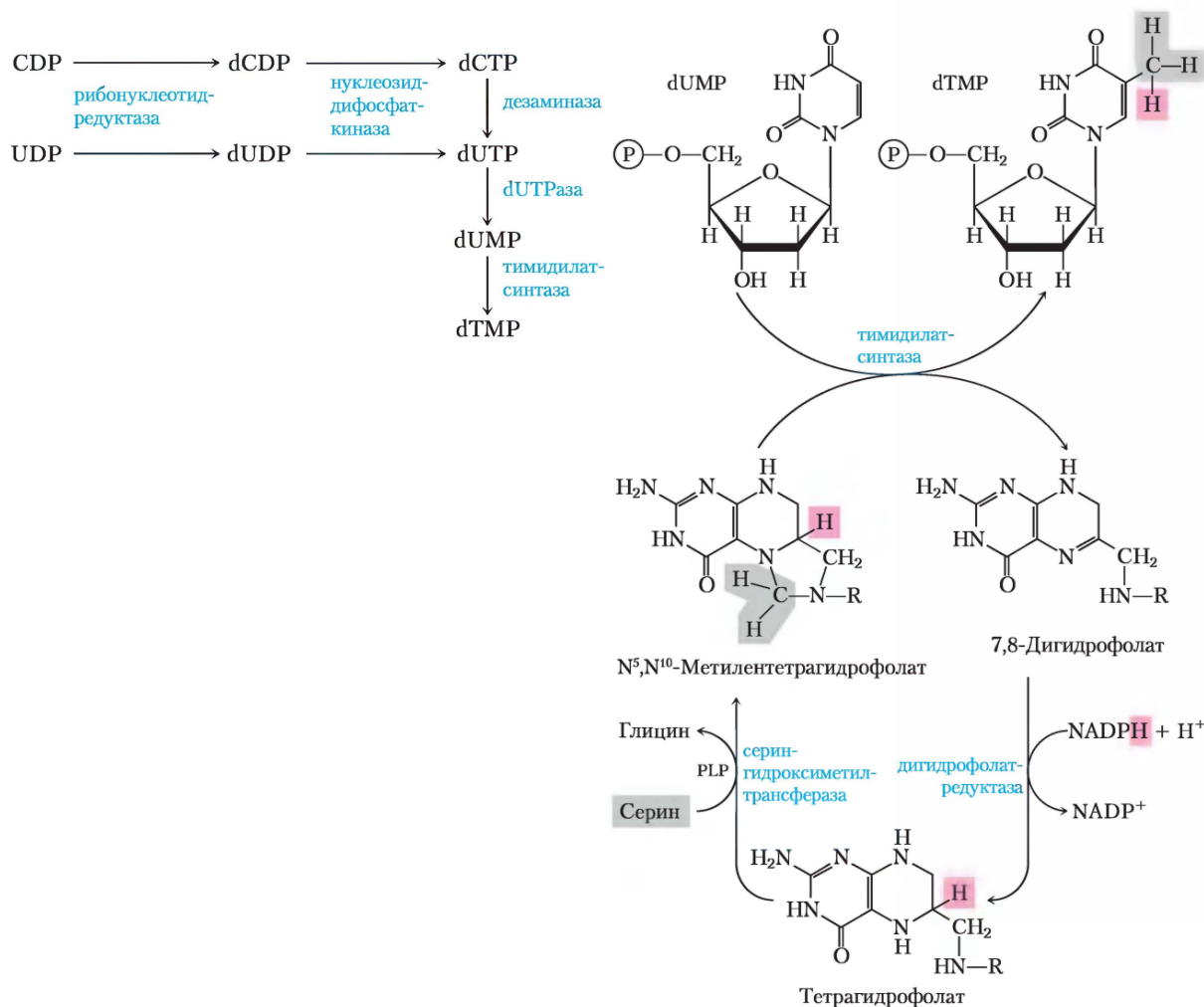


Рис. 21.1. Биосинтез тимидилата (dTMP)

Превращение dUMP в dTMP катализируется **тимидилатсинтазой**. От N⁵,N¹⁰-метилентетрагидрофолата на dUMP переносится углеродный фрагмент со степенью окисления углерода, как в гидроксиметильной группе -CH₂OH (рис. 13.3), а затем восстанавливается до метильной группы (рис. 21.1, справа).

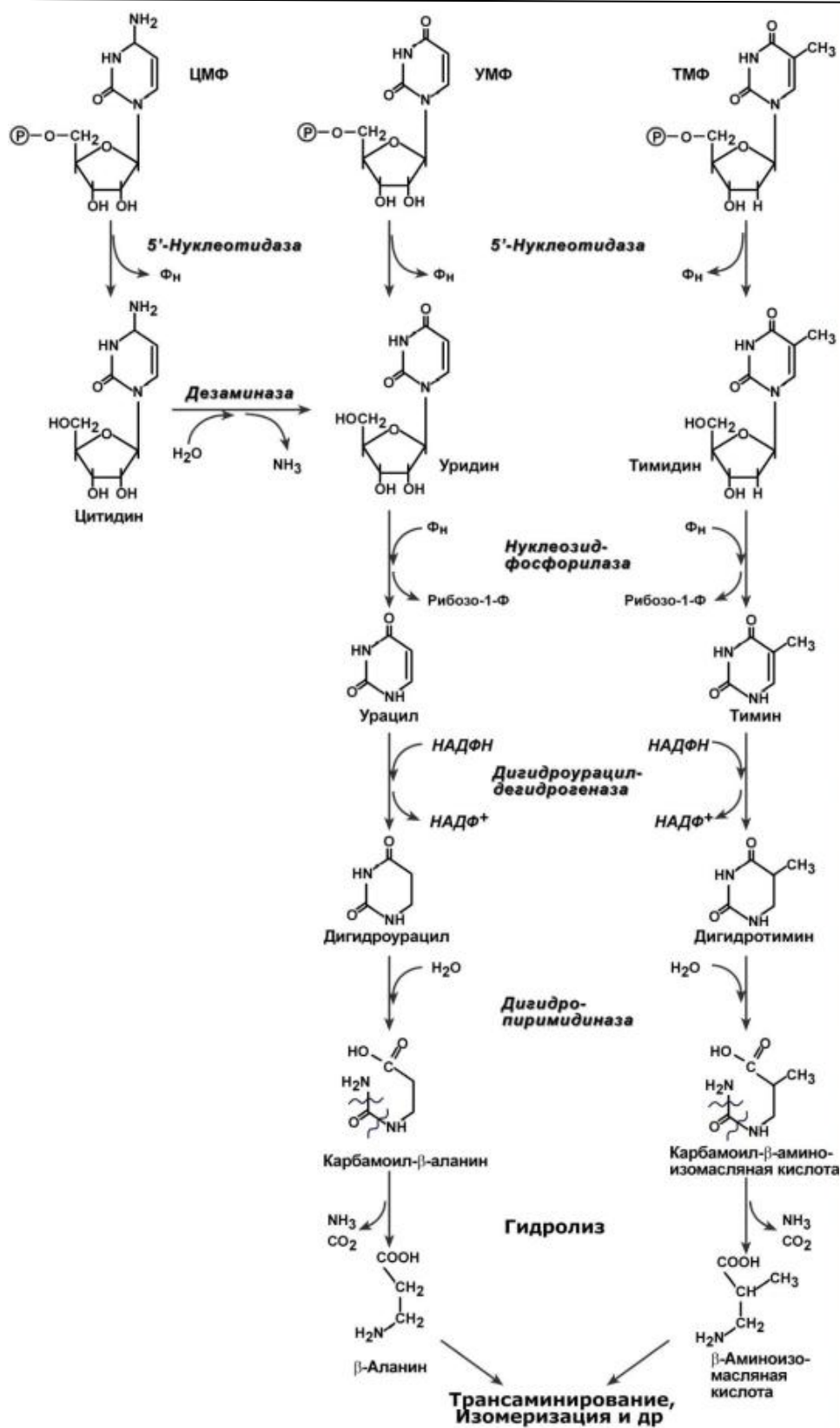


Рис. 21.2. Катаболизм пириимидиновых нуклеотидов

Это восстановление «оплачивается» окислением тетрагидрофолата до дигидрофолата, что довольно необычно для тетрагидрофолат-зависимых реакций. Дигидрофолат восстанавливается до тетрагидрофолата **дигидрофолатредуктазой** в реакции регенерации, которая почти обязательно присутствует во многих процессах с участием тетрагидрофолата. У растений и по крайней мере у одного простейшего тимидилатсинтаза и дигидрофолатредуктаза образуют один бифункциональный белок.

Катаболизм пиримидинов

Пути распада пиримидинов (рис. 21.2) главным образом ведут к NH_4^+ , а значит, к мочеvine. Тимин, например, деградирует до метилмалонилполуальдегида, интермедиата катаболизма валина. Дальше он распадается через пропионил-СoА и метилмалонил-СoА до сукцинил-СoА.

Эндокринная система, железы и их гормоны

В пределах одного метаболического пути процессы можно регулировать: включать, выключать, замедлять, ускорять. На протяжении данного курса были рассмотрены различные механизмы: ферментативная регуляция, аллостерическая регуляция, регуляция путём фосфорилирования/дефосфорилирования. Это осуществляется на уровне одного компартмента или клетки.

Гормоны – это химические посредники, которые секретируются определенными тканями в кровь или тканевую жидкость и служат для регуляции активности других клеток или тканей. В норме в организме они обычно присутствуют в низких концентрациях, но их количество может резко увеличиваться в ответ на внешнее воздействие. Гормоны продуцируются тканью одного типа, а ответ (чаще всего в виде химической реакции) вызывают в ткани другого типа. Они секретируются внутрь, поэтому такая регуляция называется эндокринной. А многие ферменты, наоборот, секретируются наружу. Такая регуляция называется экзокринной.

Большинство гормонов вырабатываются в специальных органах – эндокринных железах, или железах внутренней секреции (рис. 21.3). Высвобождение гормонов регулируется иерархически нейрональными и гормональными сигналами. Координационный центр эндокринной системы – **гипоталамус**. Это небольшая область в мозге, где принимаются и интегрируются сообщения от центральной нервной системы. В ответ на сигналы ЦНС гипоталамус вырабатывает регуляторные гормоны (релизинг-факторы), которые проходят прямо к соседней железе гипофизу по специальным кровеносным сосудам и нейронам, соединяющим обе железы (рис. 21.3). Гипофиз состоит из двух функционально различных частей. **Задняя доля гипофиза** содержит окончания аксонов множества нейронов, тела которых располагаются в гипоталамусе. Эти нейроны вырабатывают короткие пептидные гормоны **окситоцин** и **вазопрессин**, перемещающиеся вниз по аксону к нервным окончаниям в гипофизе, где они накапливаются в секреторных гранулах, ожидая сигнала к высвобождению.

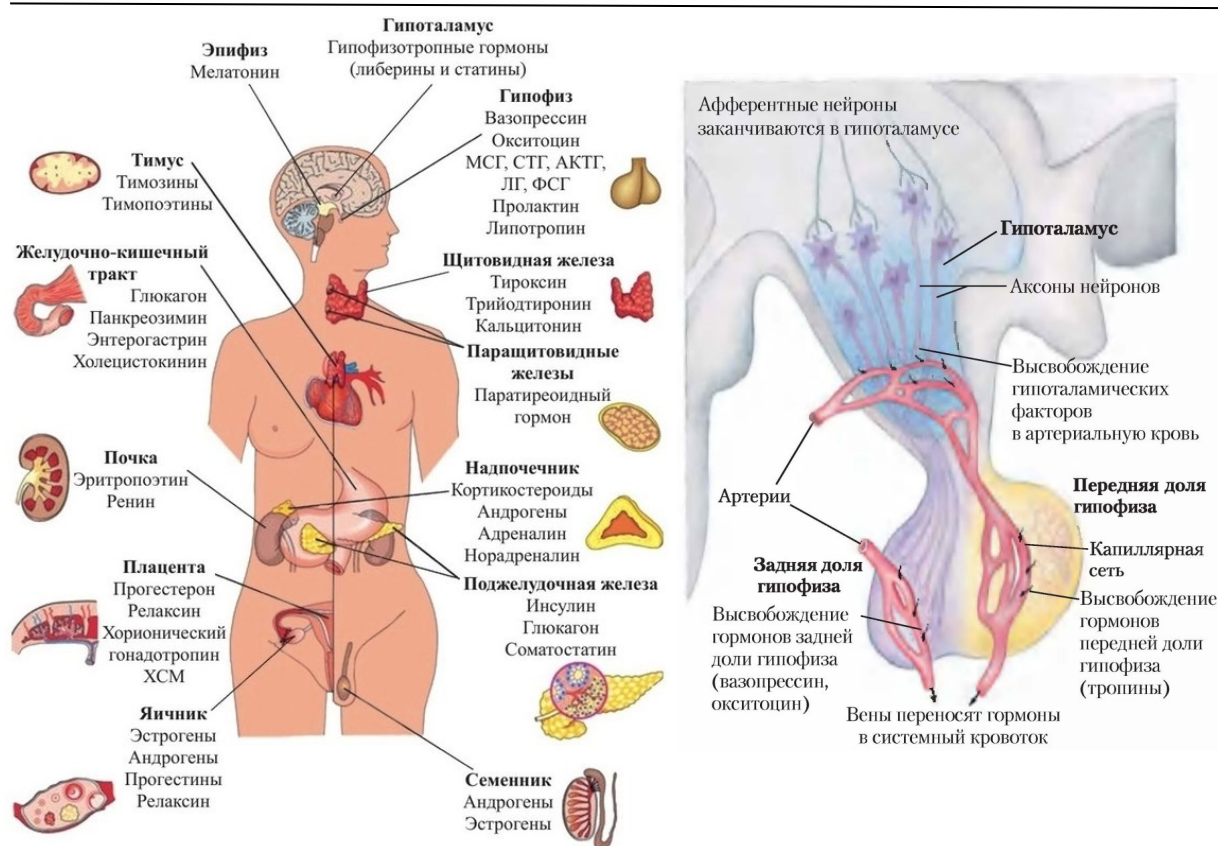


Рис. 21.3. Эндокринные железы и их гормоны

Передняя доля гипофиза отвечает на приносимые кровью гормоны гипоталамуса, вырабатывая **тропные гормоны**, или тропины (от греч. *tropos* – поворот). Это относительно длинные полипептиды, которые активируют ряд желез внутренней секреции (рис. 21.4): кору надпочечников, щитовидную железу, яичники и семенники. В ответ эти железы секретируют свои специфические гормоны, которые переносятся кровотоком к клеточным рецепторам в тканях-мишенях. Например, кортикотропин-высвобождающий гормон гипоталамуса стимулирует высвобождение АКТГ передней долей гипофиза, АКТГ направляется к пучковой зоне коры надпочечников и активирует высвобождение кортизола. Кортизол, последний гормон в этом каскаде, действует через свои рецепторы, изменяя метаболизм в клетках-мишенях разного типа. Один из эффектов кортизола в гепатоцитах – увеличение скорости глюконеогенеза.

Гормональные каскады, ведущие к высвобождению кортизола и адреналина, вызывают значительное усиление начального сигнала и позволяют очень тонко и точно регулировать поступление конечного гормона каскада. На каждом уровне каскада «малый» сигнал усиливается до «большого» ответа. Первоначальный электрический импульс, пришедший в гипоталамус, ведет к выделению нескольких наногرامмов кортикотропин-высвобождающего гормона, который усиливает сигнал, вызывая высвобождение нескольких микрограммов кортикотропина. Кортикотропин действует

на кору надпочечников, стимулируя выделение нескольких миллиграммов кортизола, в результате происходит амплификация сигнала по крайней мере в миллион раз.

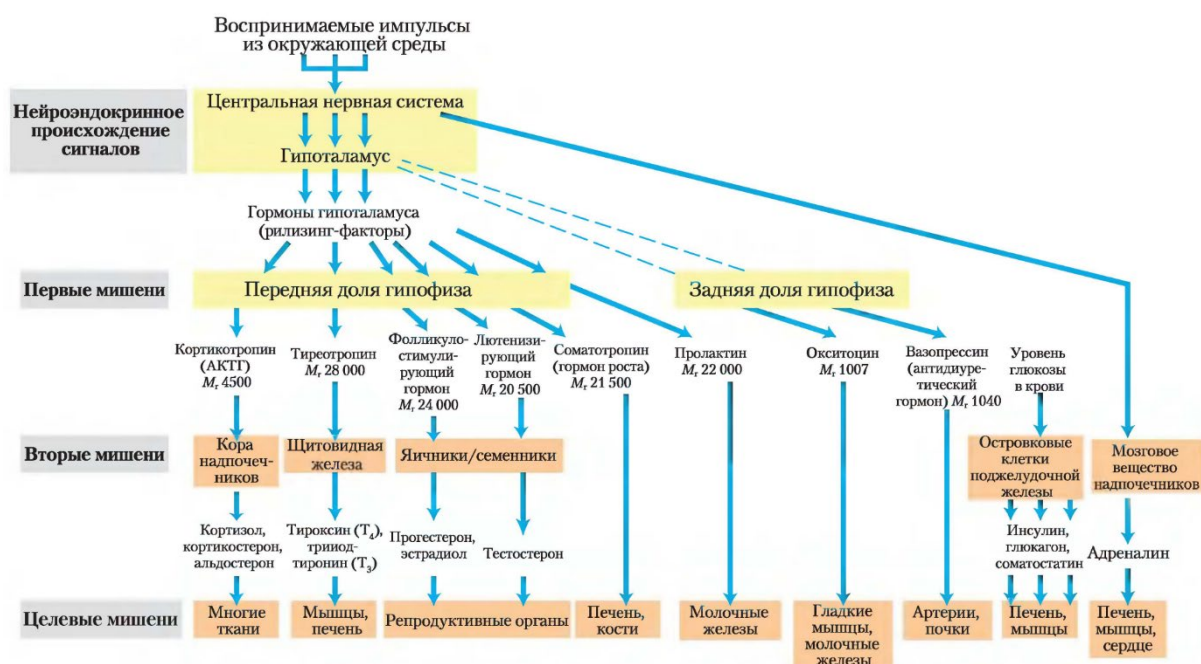


Рис. 21.4. Главные эндокринные системы и их ткани-мишени

На каждом уровне гормонального каскада возможно ингибирование ранних стадий по механизму обратной связи – завышенный сверх необходимого уровень конечного гормона или одного из промежуточных гормонов ингибирует высвобождение предыдущих гормонов каскада. Здесь механизм обратной связи приводит к тому же результату, что и механизм, лимитирующий образование продукта в путях биосинтеза: продукт синтезируется (или высвобождается) только до тех пор, пока не будет достигнута необходимая концентрация.

Часто цепочка регулируется по механизму обратной связи. Переизбыток конечных гормонов приводит к тому, что подавляется производство либеринов и тропинов. Простые с точки зрения строения гормоны производятся быстро, а другие (например, инсулин) хранятся в неактивной форме.

Классификация гормонов

В организме млекопитающих синтезируются гормоны нескольких классов, которые различаются по своей химической структуре и способам действия.

В зависимости от типа гормона взаимодействие гормона с рецептором может происходить на поверхности клетки, в цитозоле или в ядре.

Водорастворимые пептидные гормоны и гормоны-амины (например, инсулин и адреналин) действуют внеклеточно, связываясь на поверхности клетки с рецепторами, пронизывающими плазматическую мембрану (рис. 21.5). Когда гормон связывается с внеклеточным доменом рецептора, конформация рецептора меняется так же, как это

происходит у аллостерического фермента при связывании молекулы эффектора. Конформационное изменение вызывает последующие эффекты гормона. Одна молекула гормона, образуя комплекс гормон-рецептор, активирует катализатор, который вызывает продуцирование многих молекул вторичного мессенджера; таким образом, рецептор не только передает сигнал, но и усиливает его. Далее сигнал может быть амплифицирован сигнальным каскадом из последовательных стадий, в которых катализатор активирует катализатор, приводя к очень большому усилению первоначального сигнала.

Нерастворимые в воде гормоны (стероиды, ретиноиды и гормоны щитовидной железы) легко проходят через плазматическую мембрану своих клеток-мишеней к рецепторным белкам в ядре (рис. 21.5). Для этого класса гормонов характерно, что комплекс гормон-рецептор сам передаёт сигнал. Он взаимодействует с ДНК, меняя экспрессию специфических генов, при этом изменяется соотношение ферментов в клетке и, таким образом, изменяется и клеточный метаболизм.



Рис. 21.5. Два основных механизма действия гормона

Гормоны, которые действуют через рецепторы плазматической мембраны, в основном инициируют очень быстрые физиологические или биохимические ответы.

Так, уже через несколько секунд после выделения в кровоток адреналина из мозгового вещества надпочечников в скелетных мышцах происходит ответное ускоренное расщепление гликогена. Напротив, гормоны щитовидной железы и половые (стероидные) гормоны дают максимальные ответы в тканях-мишенях только через часы или даже дни. Эти различия в характерных временах ответа соответствуют различным способам действия. В основном быстро действующие гормоны вызывают изменения активности с помощью аллостерического механизма или ковалентной модификации одного или нескольких из уже существующих в клетке ферментов. Медленно действующие гормоны, как правило, меняют экспрессию генов, приводя к усилению или подавлению синтеза регулируемых ими белков.

В зависимости от пути, который проходят гормоны от центра высвобождения до ткани-мишени (рис. 21.6), существуют:

- **Эндокринные** (от греч. *endon* – внутри и *krinein* – освобождать) гормоны высвобождаются в кровь и переносятся к клеткам-мишеням через всё тело (например, инсулин).
- **Паракринные** гормоны выделяются в межклеточное пространство и диффундируют к соседним клеткам-мишеням (к такому типу принадлежат эйкозаноидные гормоны).
- **Аутокринные** гормоны высвобождаются теми клетками, на которые они же и действуют, связываясь с рецепторами на клеточной поверхности.

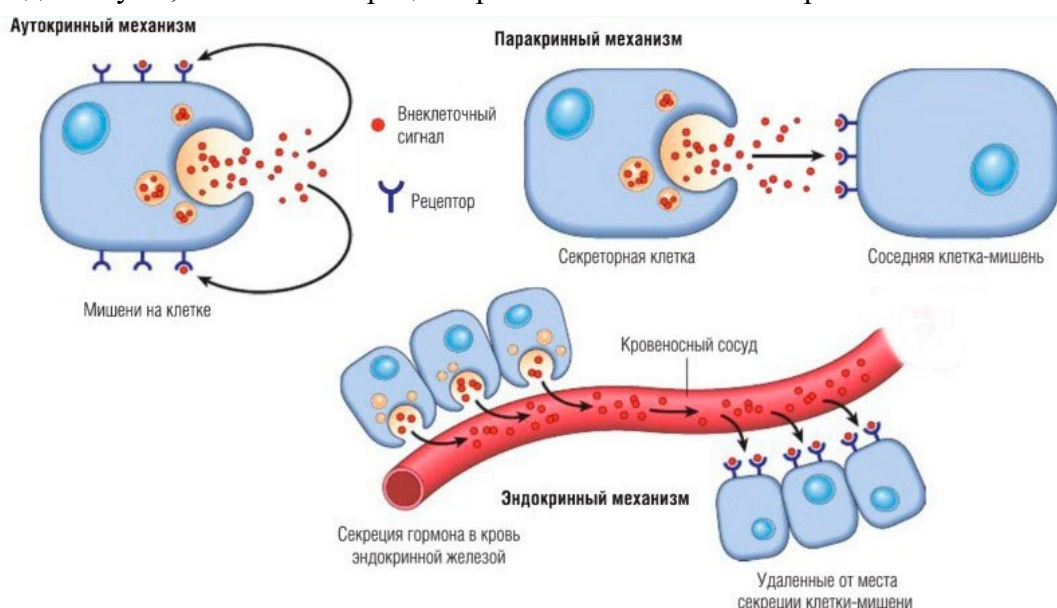


Рис. 21.6. Схемы межклеточной передачи сигнала

Адреналин и норадреналин

Водорастворимые вещества адреналин и норадреналин относят к катехоламинам из-за их структурного сходства с катехолом. Эти гормоны синтезируются из тирозина

(рис. 21.7) и секретируются надпочечниками. Как и пептидные гормоны, катехоламины содержатся внутри секреторных везикул в очень высокой концентрации, а высвобождаются посредством экзоцитоза. Действуют они, связываясь с рецепторами на поверхности клеток, что приводит к образованию внутриклеточных вторичных мессенджеров. С помощью катехоламинов осуществляется широкое разнообразие физиологических ответов на сильный стресс.

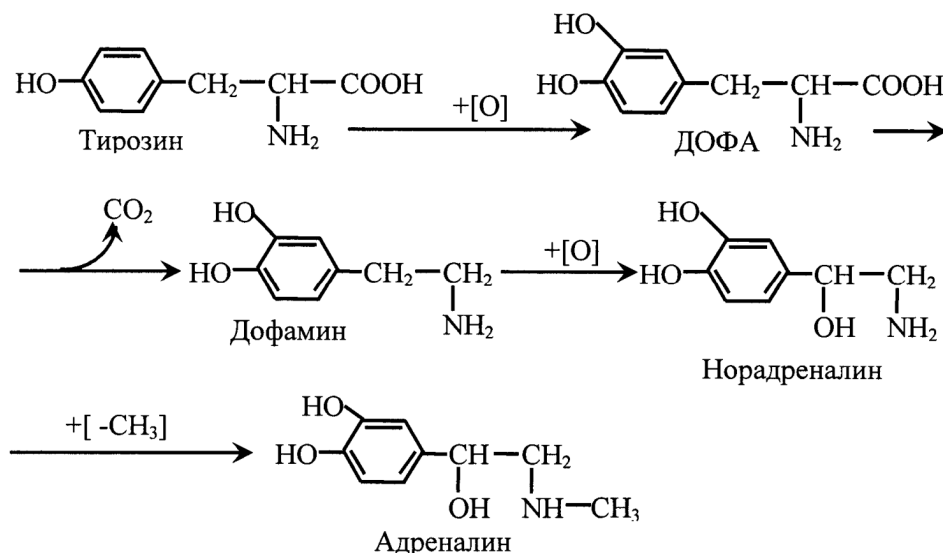


Рис. 21.7. Синтез адреналина

Адреналин запускает в клетке каскад реакций (рис. 21.8).

1. Адреналин активирует расположенный на мембране **бета-2-адренорецептор**, который имеет семь трансмембранных альфа-спиралей. Это рецептор **GPCR** (G-protein-coupled receptor), то есть сопряженный с G-белками, которые активируются после связывания рецептора с лигандом (адреналином). **G-белок** состоит из трёх субъединиц: альфа (α), бета (β) и гамма (γ). Рецептор запускает обмен (не синтез одного из другого!) GDP на GTP, в результате чего β- и γ-субъединицы отсоединяются от α-субъединицы, но остаются связанными между собой, сама α-субъединица при этом отсоединяется от всех остальных белков.

2. α-Субъединица связывается с аденилатциклазой и активирует её. Уже на этом этапе происходит так называемая амплификация сигнала, то есть один рецептор может активировать множество G-белков. Активированная **аденилатциклаза** синтезирует сАМР из АТР, отсоединяя от последнего пиррофосфат.

3. **Циклический АМР** (сАМР) связывается с двумя регуляторными субъединицами протеинкиназы А (**ПКА**), которые в связанном друг с другом виде отсоединяются от двух каталитических субъединиц.

4. Каталитические субъединицы ПКА фосфорилируют два белка – киназу фосфорилазы и гликогенсинтазу. При этом киназа фосфорилазы активируется, а гликогенсинтаза, наоборот, выключается.

5. Активная **киназа фосфорилазы** фосфорилирует фосфорилазу гликогена (гликогенфосфорилазу), которая от этого тоже активируется. Активная **фосфорилаза гликогена** фосфорилирует остатки глюкозы на молекулах гликогена, которые отщепляются в виде глюкозо-1-фосфата. На этой стадии также происходит амплификация сигнала. От глюкозо-1-фосфата можно без труда отщепить фосфат, получив обычную глюкозу. А её уже можно через специальные переносчики (GLUT) транспортировать в кровь.

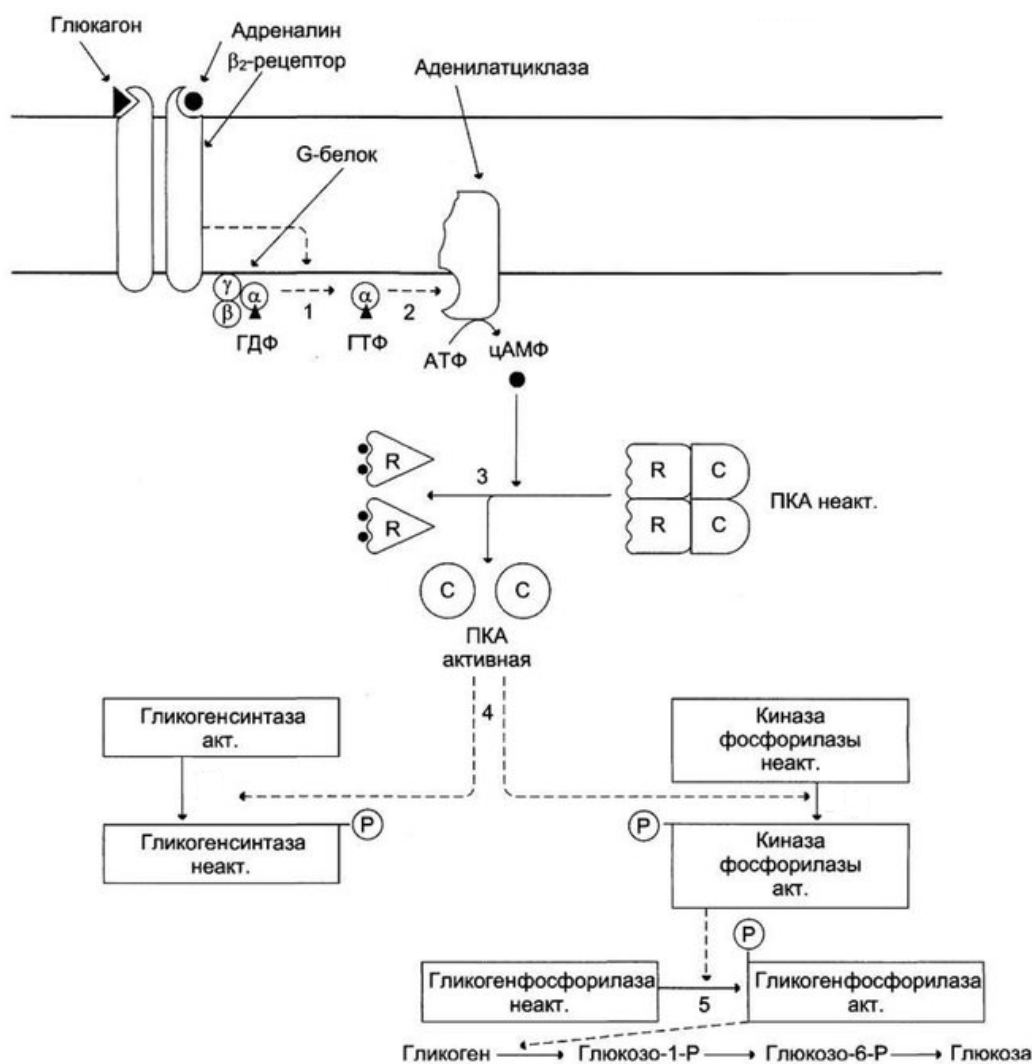


Рис. 21.8. Адреналиновый каскад

Стоит отметить, что в каждой реакции фосфорилирования происходит амплификация сигнала. Ведь, например, одна и та же киназа фосфорилазы может последовательно фосфорилировать много фосфорилаз гликогена. Фосфат для каждой реакции фосфорилирования переносится с молекулы АТФ, превращая его в АDР. Подобный каскадный механизм позволяет значительно усилить первоначальный сигнал.

Многие процессы здесь происходят последовательно и независимо друг от друга, так что не стоит рассматривать это как последовательность реакций.

Поскольку связь адреналина с рецептором непрочная, адреналин со временем отделяется от него. Через какое-то время α -субъединица самопроизвольно гидролизует GTP до GDP и фосфата, отсоединяется от аденилатциклазы и обратно связывается с β -, γ -субъединицами и уже инактивированным адренорецептором. Аденилатциклаза, от которой ушла α -субъединица, выключается и перестаёт синтезировать сАМР. Всегда активная **фосфодиэстераза** расщепляет сАМР, из-за чего инактивируется протеинкиназа А, собираясь обратно в комплекс из четырёх субъединиц. Параллельно с этим фосфатазы отщепляют фосфат от всех фосфорилированных белков, инактивируя их.



ХИМИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ