БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

БИОФИЗИКА. ЧАСТЬ 2

РУБИН
АНДРЕЙ БОРИСОВИЧ

БИОФАК МГУ

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

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

БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
СТУДЕНТА БИОЛОГИЧЕСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ
БУКРЕЕВА АЛЕКСАНДРА ИГОРЕВИЧА

Оглавление

Лекция 1 5

О предмете биофизики 5

Лекция 2 7

Люминесценция в биологических системах 8

Тушение флуоресценции 16

Миграция энергии 18

Хемилюминесценция 23

Биолюминесценция 24

Лекция 3 26

Классическая термодинамика 26

Соединение кинетики и термодинамики 31

Лекция 4 33

Электрохимический потенциал и электродиффузия 33

Обмен (антипорт) 40

Симпорт (котранспорт) 44

Насосы: первичный активный транспорт 47

Ионные каналы 51

Лекция 5 57

Изменение энтропии в открытых системах 57

Соотношение Онзагера 58

Сопоставление скорости изменения энтропии с приближением системы к стационарному состоянию 61

Применение теории информации в биологии 63

Лекция 6 66

Работа биологической системы на молекулярном уровне 66

Гидрофобные взаимодействия 67

Ван-дер-ваальсовые взаимодействия 70

Торсионный потенциал вращения 72

Кооперативные взаимодействия дальнего порядка 73

Лекция 7 82

Исследование активности нейронов in vivo 82
Метод функционального ядерного магнитного резонанса fMRI. 83
Потребление энергии мозгом, его устройство и морфология 86
Оптимизация затрат АТФ на уровне пресинаптической мембраны 89
Оптимизация затрат АТФ на уровне постсинаптической мембраны 92
Оптогенетика 97
Связь физико-химических свойств мембраны с потенциалом действия нейрона 97

Лекция 8 100

Внутримолекулярная динамика белка. Гемоглобин. 100
Люминесцентные метки 102
Метод электронного парамагнитного резонанса 104
Ядерный магнитный резонанс 108
Метод мессбауэровской спектроскопии или ядерного гамма-резонанса (ЯГР) 109
Конформационная подвижность белков 111
Метод моделирования внутримолекулярной динамики 112

Лекция 9 116

Механизм действия ферментов 116
Перенос электронов 118
Молекулярные моторы 119

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

Лекция 1

О предмете биофизики

Биофизика – типичная междисциплинарная область знаний, пограничная наука, которая родилась на стыке биологии и точных наук: физики, математики и физ. химии.

Живые системы, как выделяли ранее, обладают уникальными свойствами: раздражимостью, наследственностью, изменчивостью и метаболизмом – способностью к превращениям химических веществ. Наличие метаболизма в этом списке отражает тот факт, что раньше ему, как основе всех процессов, не придавали должного значения. Биохимия, как основа всего, как область занимающаяся природой материальных носителей жизненных процессов стала на текущий момент не просто интегративной наукой, а фундаментальной пограничной наукой.

Биофизика прошла тот же самый путь.

Физика – наука, которая занимается механизмами фундаментальных взаимодействий, которые лежат в основе движения материи.

Биофизика – наука о механизмах фундаментальных физических и физико-химических взаимодействий, лежащих в основе биологических явлений.

Раньше ученые, такие как Ломоносов, Галилей и т.д., имели энциклопедические знания и энциклопедический интерес. Деятельность Галилея и Декарта можно отнести к началу 17-го века. С этого момента можно говорить о зарождении науки. Декарт занимался одновременно и проблемами математики, и изучением механики. При этом, он был биомехаником и занимался применением законов физики к живым существам.

Гарвей, который открыл большой и малый круги кровообращения, был медиком, но при этом говорил о механизмах кровообращения на основе законов гидродинамики.

При этом, параллельное развитие в направлениях физики и химии приводило к накоплению данных в биологии, которые человечество пыталось как-то описать.

При этом возникал вопрос, подчиняется ли биологический объект каким-то законам. Даже сейчас вопрос о том, как сочетаются законы в биологической системе – не очень простой. При этом, математические модели, которые мы применяем, являются следствием, а не самоцелью.

Сильный толчок в области биомеханики был сделан Эйлером. Ломоносов больше, в области биологии, интересовался вопросам цветного зрения и вкусовых ощущений.

Принципиальные вещи были сделаны в работах Лавуазье, который показал, что процесс дыхания – это медленное горение. Дальше появились законы Ньютона – основы механики.

Все подобные прорывы сопровождали слияние наук, но не полное. Очень сильный толчок был дан увеличением объема наших знаний и развитием смежных областей.

В области физической химии – принципиальный шаг вперед – теория растворов Аррениуса. Появились основы термодинамики и основные представления о превращениях энергии, что является основной проблемой в биологии. Тут и начинается биофизика.

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

Связь и различие между биофизическим и биохимическим подходом можно рассмотреть на примере гемоглобина. Биохимия дала расшифровку всем последовательным биохимическим стадиям оксигенации. Остается вопрос, почему такое небольшое движение атома железа, при связывании кислорода, вызывает такие конформационные изменения и в чем их движущая сила. В этом и заключается биофизический подход.
В области термодинамики, превращения настолько органичны, что кажется, что нарушается второй закон термодинамики.
Основные проблемы современной биофизики:

- термодинамика, ее возможности и ограничения применения в биологии
- квантовая механика, перенос электрона
- динамика белков

Биофизика является одним из примеров внедрения методов точных наук для решения биологических задач.
План курса:

1. Теоретическая биофизика
    a. Биофизика сложных систем
        1.Кинетика биологических процессов
        2.Регуляция
        3.Термодинамика
        4.Биологическая информация
    b. Молекулярная биофизика
        1.Пространственная организация и динамика биополимеров
        2.Электронные свойства
        3.Механизмы трансформации предметов
2. Биофизика клеточных процессов
    a. Биофизика мембранных процессов
    b. Проблема рецепции
    c. Экологическая биофизика

«Все великие достижения биологии были сделаны биологами без систематического привлечения идей физики, физической химии и математики. Сейчас мы получили ситуацию, когда клетка представляется в виде набора отдельных белок-машин, которые подобно линиям на заводе обмениваются продуктами друг с другом. И вопрос состоит в том, как понять их поведение. Это невозможно сделать без привлечения точных наук.»

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

Лекция 2

В данной лекции в деталях будут рассмотрены нюансы в люминесцентном анализе и некоторые примеры применения данного метода, который обладает чрезвычайно высокой чувствительностью и широко используется в различных исследованиях.
Наиболее известный пример люминесценции – люминесценция хлорофилла. На рис. 3.1 показан спектр поглощения хлорофилла и соответствующий спектр люминесценции. Спектр люминесценции отражает самый нижний энергетический уровень, т.е. первое возбужденное состояние хлорофилла.

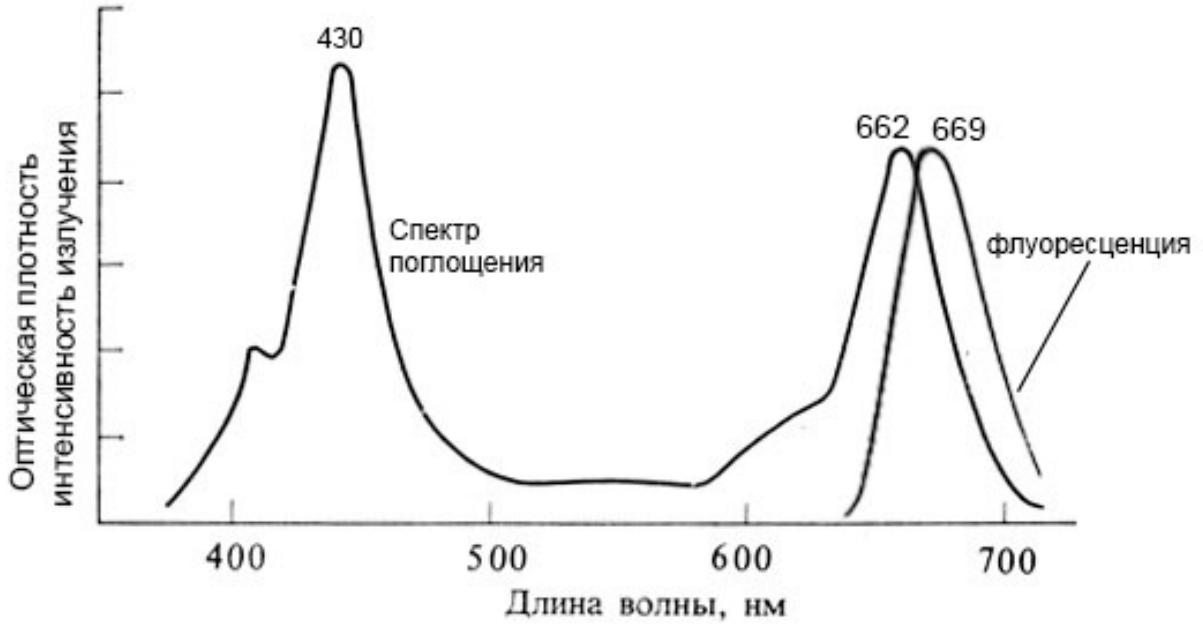


Рисунок 3.1. Спектр поглощения и флуоресценции раствора хлорофилла

Помимо хлорофилла, существует большое количество различных флуоресцирующих соединений (рис. 3.2). Как видно из изображения, большинство люминесцирующих молекул, как правило, полициклические соединения. Это связано с тем, что в полициклических соединениях электронные энергетические уровни находятся в той области, в которой они не перекрываются колебательными и вращательными степенями свободы. Поэтому, для таких молекул характерно то, что на достаточно длительное время может сохраняться возбужденное состояние, т.е. они имеют достаточно большое время жизни и вероятность испускания квантов света достаточно велика.

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

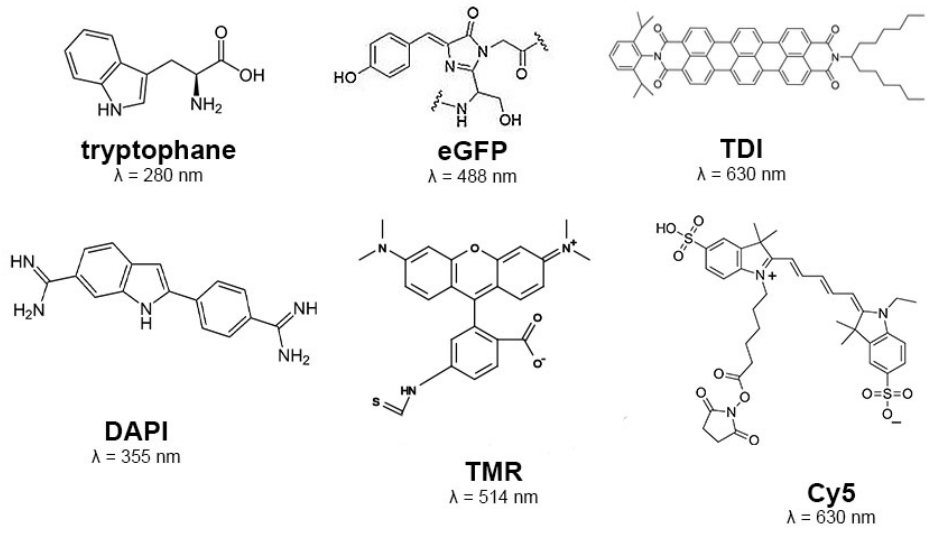


Рисунок 3.2. Типичные люминесцирующие соединения.

Если говорить в общем, то практически все соединения так или иначе могут люминесцировать, но большинство имеют очень низкий квантовый выход, в отличие от представленных на рисунке. Некоторые модификации люминесцирующих соединений, которые показаны на рис.3.3, имеют разные заместители в своей циклической структуре. Эти заместители позволяют получать принципиально разные спектры люминесценции, которые могут быть хорошо визуализированы.

Люминесценция в биологических системах

Биологические люминесцирующие молекулы:

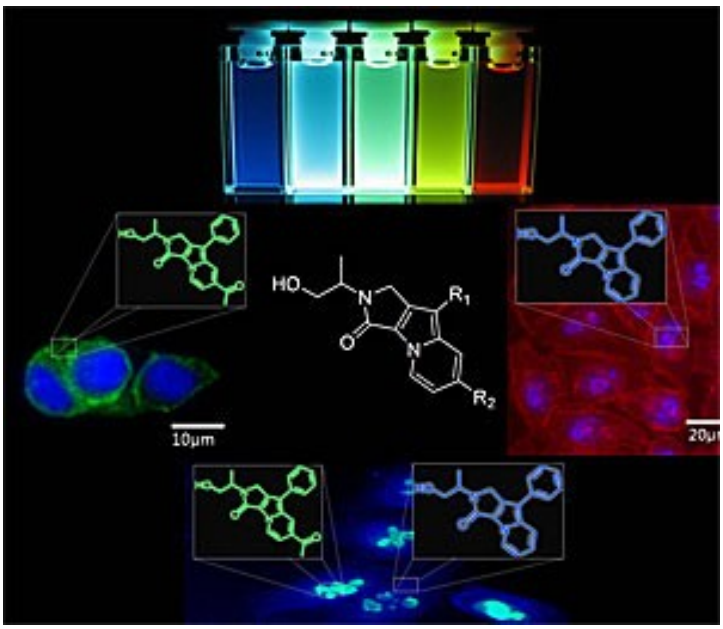


Рисунок 3.3. Влияние заместителей на спектр люминесценции

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

1. белки
2. пиридиннуклеотиды (НАД и НАДФ)
3. флавины
4. многие витамины (напр. рибофлавин, цианокобаламин, α-токоферол)
5. серотонин
6. пигменты растений, бактерий и водорослей (хлорофиллы, фикобилины)

Основную роль в свечении белков играют ароматические аминокислоты, в частности, триптофан. На рис. 3.4 представлены спектры поглощения основных аминокислот, которые дают люминесценцию. Здесь показаны тирозин, триптофан и фенилаланин – те циклические аминокислоты, которые участвуют в данном процессе. Более длинноволновым из них является триптофан, за счет переноса энергии, о котором будет сказано позднее.

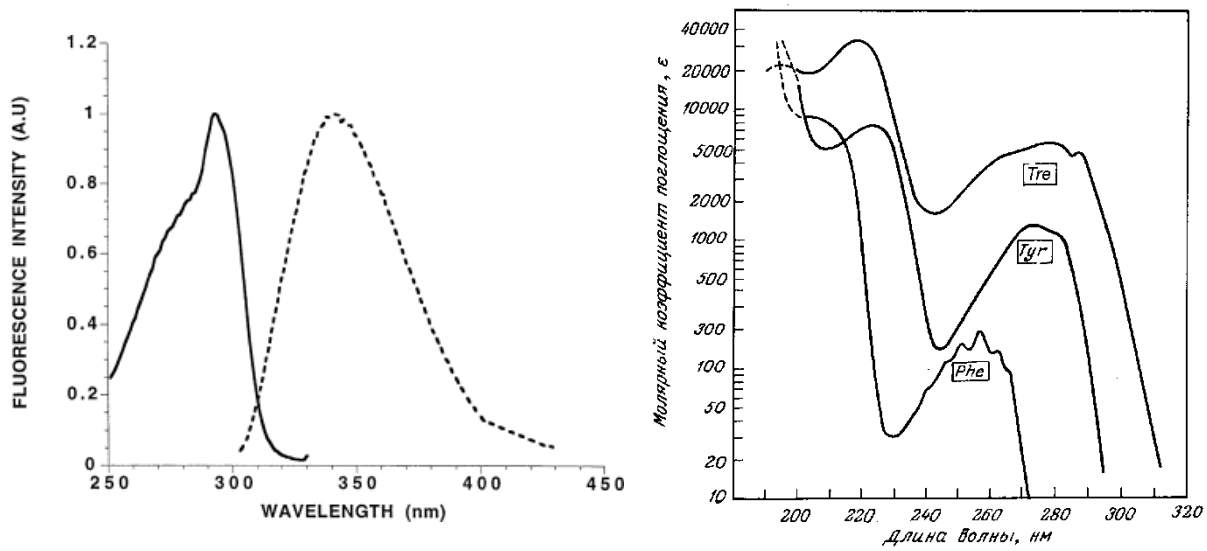


Рисунок 3.4. Спектры поглощения белка и ароматических аминокислот

В аналитике очень часто используется люминесценция эндогенных флуорофоров, для определения их количества. Однако, нужно иметь ввиду, что зависимость интенсивности люминесценции от концентрации нелинейная (рис.3.5) и имеет вид (3.1). Однако, при переходе к большим концентрациям она может принимать вид прямой и даже снижаться.

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

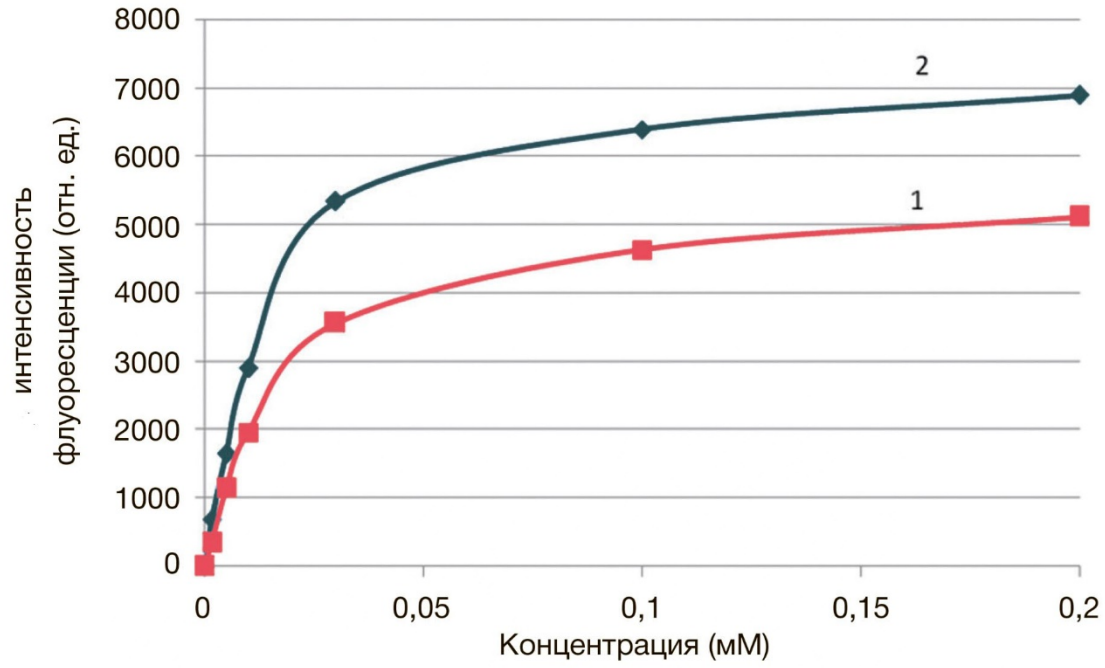


Рисунок 3.5. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации флуорофора

$$I_л = I_o\eta(1-T) = I_o\eta(1-10^{-\varepsilon cl}), \quad (3.1)$$

где I_o – интенсивность падающего света,
η – квантовый выход,
T – коэф. поглощения в этой системе

- Эффект экранирования вызван поглощением части возбуждающего света посторонними веществами и приводит к уменьшению количества фотонов поглощаемых флуорофором, а следовательно, и к снижению интенсивности флуоресценции.

- Реабсорбция (перепоглощение) — это поглощение квантов люминесценции в толще самого образца. Как правило, реабсорбция наблюдается в объектах с большой оптической плотностью. Реабсорбция приводит к ослаблению интенсивности люминесценции в коротковолновой части спектра и искажению спектра флуоресценции.

Реабсорбция связана с перекрыванием спектров поглощения и люминесценции, из-за чего испускаемые при люминесценции кванты поглощаются самим объектом и спектр люминесценции смещается в длинноволновую область.

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

Самый простой способ наблюдения люминесценции, для случаев, когда известны области возбуждения и люминесценции объекта, это использование флуориметра с системой скрещенных фильтров (рис. 3.6).

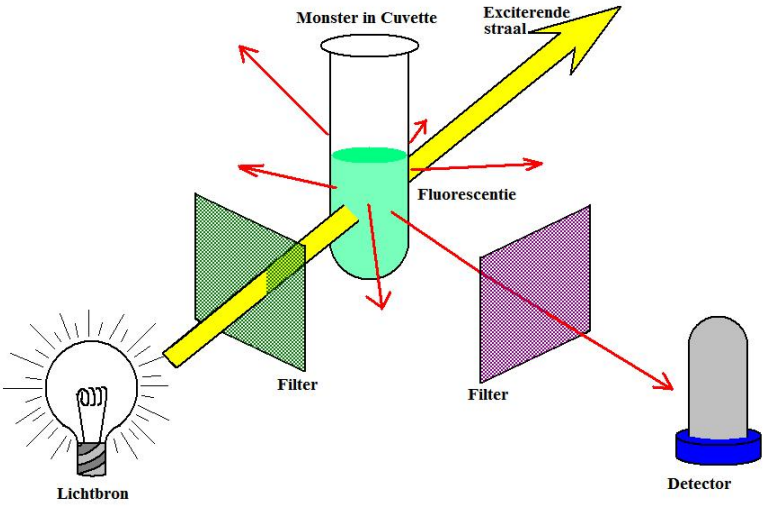


Рисунок 3.6. схема флуориметра со скрещенными фильтрами

Элементы флуориметра со скрещенными фильтрами:

1. Источник света
2. Входной фильтр, удаляющий все длины волн, кроме возбуждающих
3. Исследуемый объект
4. Фильтр, не позволяющий возбуждающему свету проходить к детектору
5. Детектор – фотодиод или фотоумножитель

Существует более сложный прибор, позволяющий исследовать и спектр возбуждения, и спектр люминесценции – спектрофлуориметр (рис. 3.7).

Основные элементы спектрофлуориметра:

1. Источник света
2. Оптика, собирающая свет в узкий пучок
3. Монохроматор возбуждающего света, выделяющий из всего пучка тот участок, который необходим для возбуждения
4. Объект

5. Монохроматор, выстапающий в роли анализатора спектра люминесценции.

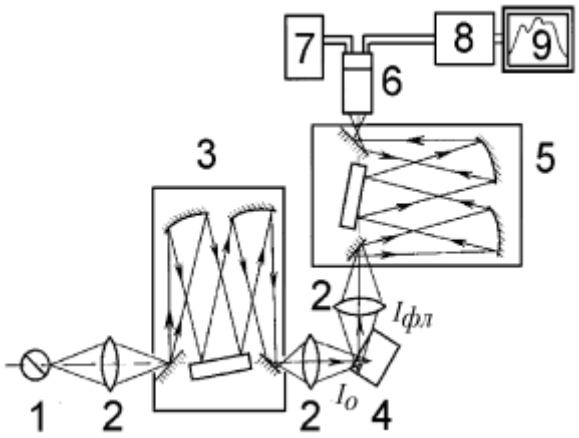


Рисунок 3.7. Оптическая схема спектрофлуориметра

При сканировании первым монохроматором можно получить спектр возбуждении, при сканировании вторым – сам спектр люминесценции при заданной длинны волны возбуждения.

Спектр возбуждения раствора пигментов растений, при сравнении со спектром поглощения, позволяет понять, какие пигменты передают энергию на хлорофилл. Так пигменты, не участвующие в переносе энергии не будут проявляться на спектре возбуждения, а, к примеру, фикобилины обычно имеют яркий пик на спектре.

Для наблюдения люминесценции на уровне клеток и органелл используется флуоресцентная микроскопия (рис. 3.8).

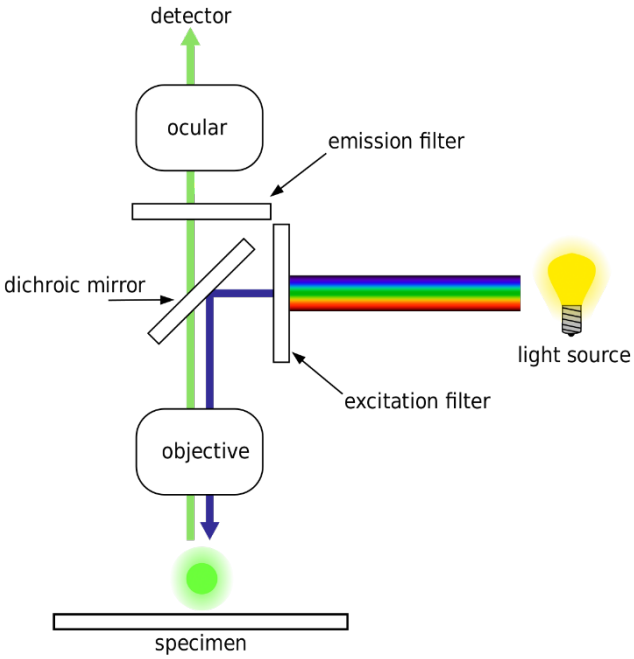


Рисунок 3.8.Схематичное изображение принципа действия флуоресцентного микроскопа

Принцип действия флуоресцентного микроскопа:

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

1. Свет от источника проходит через входной светофильтр, который пропускает лишь необходимую часть спектра
2. Пучок света от светофильтра отражается от полупрозрачного зеркала, отражающего коротковолновый свет, и попадает через объектив на объект.
3. Излучение объекта проходит через объектив и полупрозрачное зеркало, после чего идет на выходной светофильтр, откуда уже идет к окуляру.

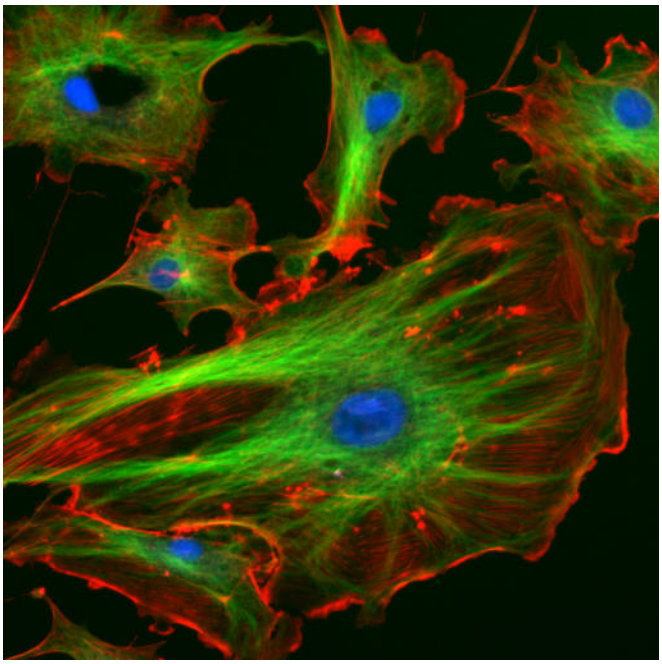


Рисунок 3.9. Изображение структур клетки, полученное методом флуоресцентной микроскопии.

Влияние микроокружения на спектры и квантовый выход флуоресценции.
Люминесцирующие молекулы очень чувствительны к своему окружению, из-за большой длительности жизни возбужденного состояния (не менее 10^{-8} сек для флуоресценции и 10^{-6} для фосфоресценции). В таких условиях происходит установление равновесия возбужденных молекул со средой. Поэтому, свойства такой молекулы могут отличаться в зависимости от окружения (табл.1). Примечательно, что чем выше полярность растворителя, тем в более длинноволновую область смещается максимум люминесценции и тем меньше квантовый выход.

Растворитель	Диэл. Проницаемость (ε)	Λ (нм)
Гептан	1,9	436
Толуол	2,4	472
Бутанол	17,7	545
Метанол	32,7	547
Вода	80	560

Таблица 1. Зависимость максимума спектра флуоресценции диметиламинохалкона (ДМХ) от полярности растворителя

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

Существуют также методы определения липофильности компартментов, основанные на изменении квантового выхода помещенных в них люминесцирующих структур. Так, например, при помощи флуоресцентных меток(рис.3.10) можно исследовать свойства мембран и выяснить величину диэлектрической проницаемости на разном расстоянии от поверхности.

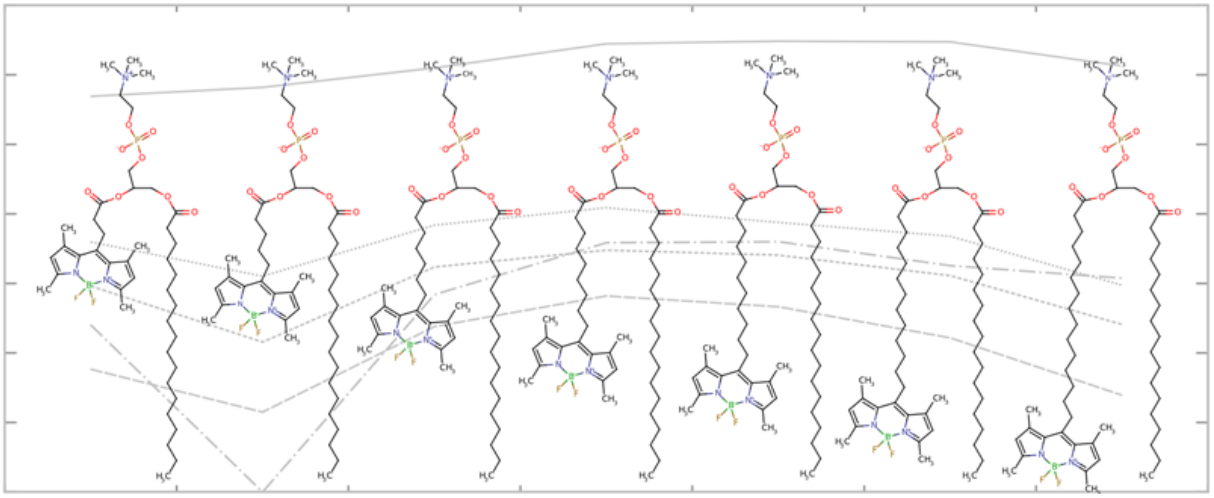


Рисунок 3.10. Набор флуоресцентных меток для исследования свойств мембран на разном расстоянии от поверхности

Группы флуоресцентных веществ, применяемых в биологии:

- Флуоресцентные метки – флуоресцирующие молекулы, связывающиеся с изучаемыми структурами ковалентно
- Флуоресцентные зонды – флуоресцирующие молекулы, свободно распределяющиеся в биологическом объекте

Флуоресцеин – классический пример флуоресцирующей молекулы, применяемой в биологических исследованиях (рис. 3.11). В форме флуоресцеиндиацетата он не обладает собственной флуоресценцией. Однако, попадая в клетку, он, будучи неполярной молекулой, легко проходит через мембрану и подвергается действию эстераз, отсоединяющих ацетатные группы.

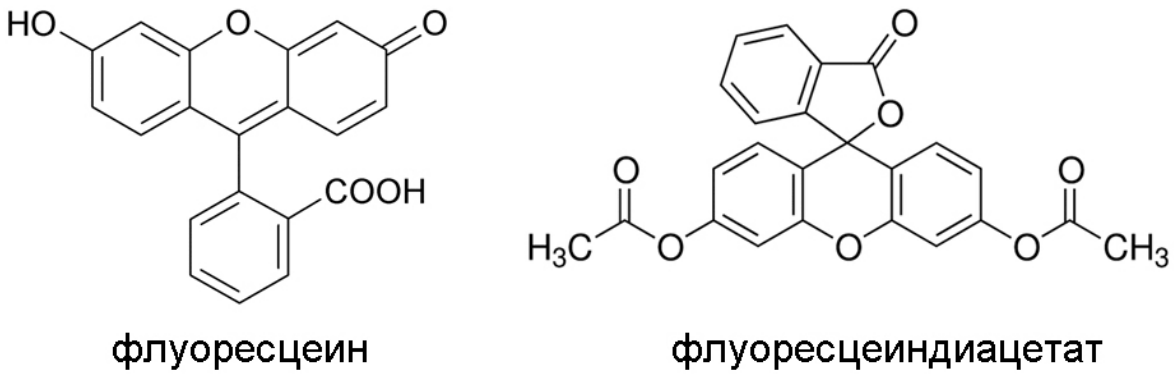


Рисунок 3.11. Структурные формулы флуоресцеина и флуоресцеиндиацетата.

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

Флуоресцеин имеет еще одно уникальное свойство – он способен изменяться в зависимости от величины pH (рис. 3.12), что влияет и на спектры возбуждения, и на спектры люминесценции.

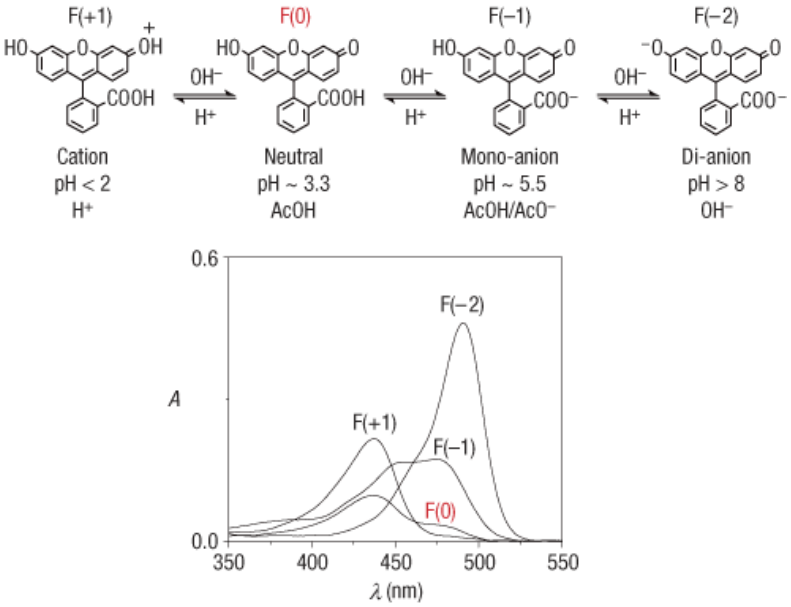


Рисунок 3.12. Изменения спектра возбуждения флуоресцеина в зависимости от pH раствора.

На данный момент известно огромное количество зондов. Один из самых эффективных зондов для определения внутриклеточного pH на данный момент – SNARF-1(рис.3.13).

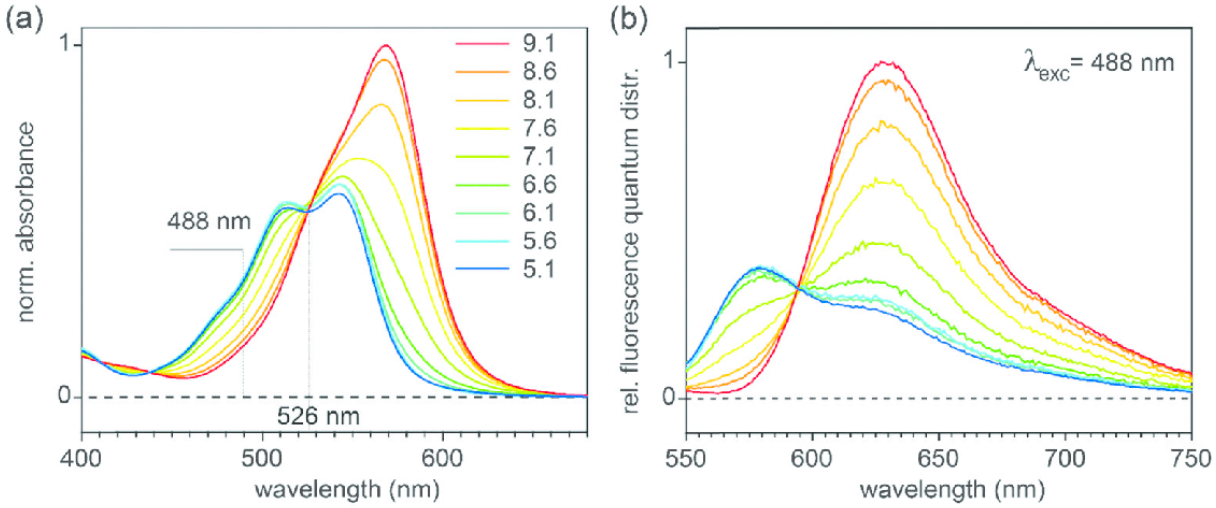


Рисунок 3.13. pH-зависимость спектров флуоресценции зонда SNARE-1 при разных условиях возбуждения

Кроме pH при помощи зондов можно измерить большое кол-во различных физико-химических внутриклеточных параметров: окислительно-восстановительный pH, концентрацию различных ионов, скорость дыхания и т.д.

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

Тушение флуоресценции

Тушение – явление, при котором флуоресцирующая молекула передает возбуждение на молекулу-тушителя, которая, в свою очередь, возвращается в основное состояние, испустив энергию в виде тепла. Этим обусловлено отличие выхода люминесценции от единицы. Описывается уравнением Штерна-Фольмера (3.2)

$$I_T = \frac{I_0}{1 - K[T]t_{\text{возб}}} \qquad (3.2)$$

где I_T – интенсивность потушенной флуоресценции,
I_0 – интенсивность флуоресценции без тушителя,
K – константа взаимодействия,
[T] – концентрация тушителя,
$t_{возб}$ – время жизни возбужденного состояния

Виды тушения флуоресценции:

- Внутреннее тушение – обусловлено безызлучательными переходами внутренней конверсии и колебательной релаксации. Наиболее ярко оно проявляется в симметричных структурах с большим числом сопряженных связей, конформационно нежестких структурах.
- Температурное тушение – является разновидностью внутреннего. Под влиянием температуры способность молекулы деформироваться растет, и, как следствие, растет вероятность безызлучательных переходов.
- Внешнее статическое тушение – основано на взаимодействии люминесцирующего соединения с другой молекулой и образованием неизлучающего продукта. (Статическое тушение не приводит к изменению времени жизни возбужденного состояния люминофора).
- Динамическое тушение – наблюдается, когда возбужденная молекула люминофора сталкивается с молекулой тушителем и передает ей свою энергию. (Динамическое тушение снижает время жизни возбужденного состояния люминофора).
- Концентрационное тушение – результат поглощения молекулами вещества собственного излучения.

Время жизни возбужденного состояния вещества – время, за которое количество возбужденных молекул снижается в e раз (e = 2,71), (рис. 3.14).

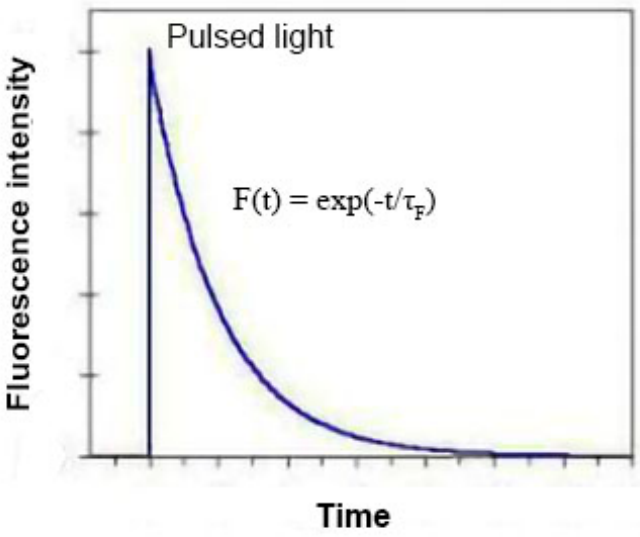


Рисунок 3.14. Экспоненциальное уменьшение населенности возбужденного состояния

Время жизни возбужденного состояния вещества можно определить методом лазерной спектрометрии и на основании его – судить о том, каким образом происходит тушение. На основании этих данных можно определить, к примеру, концентрацию кислорода в определенном компартменте. Для этого пирен или пиренбутират загружается в клетку и, благодаря тому что он способен тушиться молекулами кислорода, по интенсивности его люминесценции можно определить концентрацию O_2.

Также может использоваться метод иммунофлюоресценции. Его особенность в том, что флуоресцирующая метка ковалентно связывается с антителом изучаемого антигена (рис. 3.15). Это очень чувствительная методика, на основе которой создан метод Rapid Test.

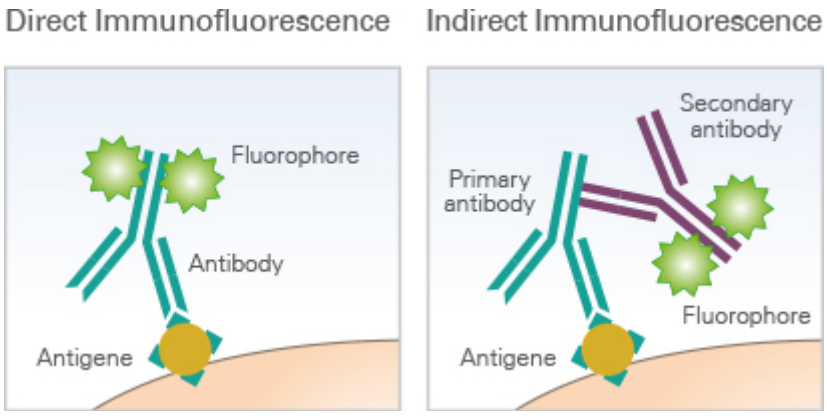


Рисунок 3.15. Принцип метода иммунофлюоресценции

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

Миграция энергии

Миграция энергии – безызлучательный перенос энергии возбуждения, либо внутри молекулы, либо с одной молекулы на другую. Миграция энергии возбуждения происходит на большие расстояния без непосредственного контакта донора и акцептора. Впервые миграция энергии была открыта в молекуле белка миоглобина. Было выяснено, что при поглощении света гемом (410 нм) происходит перенос электрона на более высокую, разрыхляющую орбиталь, и CO удаляется из молекулы миоглобина (рис. 3.16). Однако, такой же эффект имело возбуждение светом самого белка (280 нм), что говорило о миграции энергии с белка на гем.

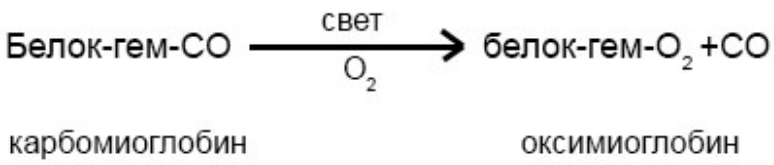


Рисунок 3.16. Схема реакции взаимодействия карбомиоглобина с кислородом

Условия миграции энергии (рис. 3.17):

1. Донор должен иметь способность к люминесценции.
2. Спектр возбуждения акцептора и люминесценции донора должны хорошо пересекаться

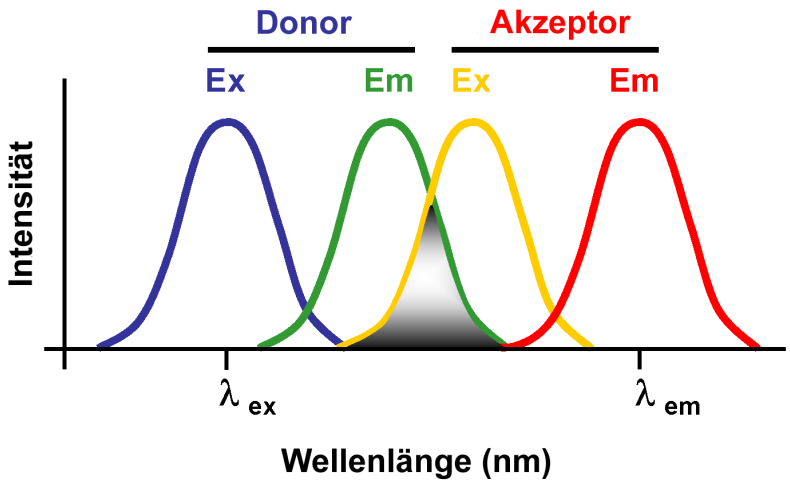


Рисунок 3.17. Пример спектров молекул, удовлетворяющих условиям для миграции энергии между ними

Миграция энергии – важная часть процессов фотосинтеза.

Экситонный механизм миграции энергии – механизм, при котором одинаковые молекулы, находящиеся на близком расстоянии, обмениваются энергией. Время жизни подобного состояния меньше 10^{-12} с (происходит раньше тепловой деградации).

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

Происходит данная передача при больших энергиях взаимодействия между молекулами ($\approx 10^{-2}$ эВ). Важно понимать, что такое возбуждение охватывает сразу несколько молекул. Данный механизм передачи используется в антенных комплексах, где реакционный центр обслуживает обычно около 300 пигментов (рис. 3.18). Пигменты реакционного центра в данной системе имеют самый низкий энергетический уровень, из-за чего всю антенну можно представить в виде «воронки», где все процессы миграции энергии «вниз» проходят с огромной эффективностью (95-96%). Время, от момента получения энергии антенным комплексом, до получение её реакционным центром – около 10^{-10} сек.

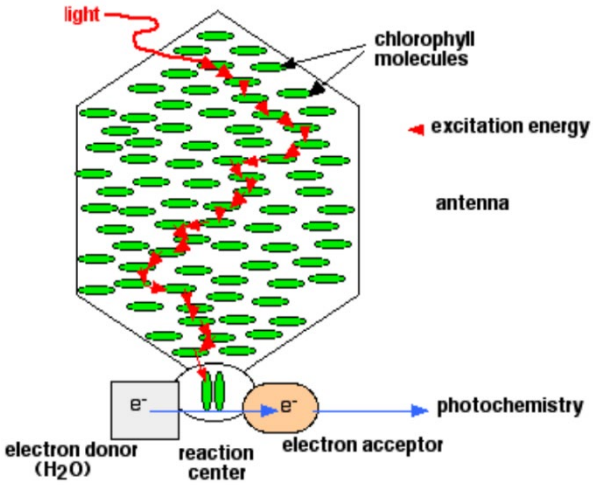


Рисунок 3.18. Экситонная миграция энергии в антенном комплексе.

Флуоресценция флуоресцентного аппарата растительных объектов имеет огромное функциональное значение, т.к. позволяет исследовать его состояние.

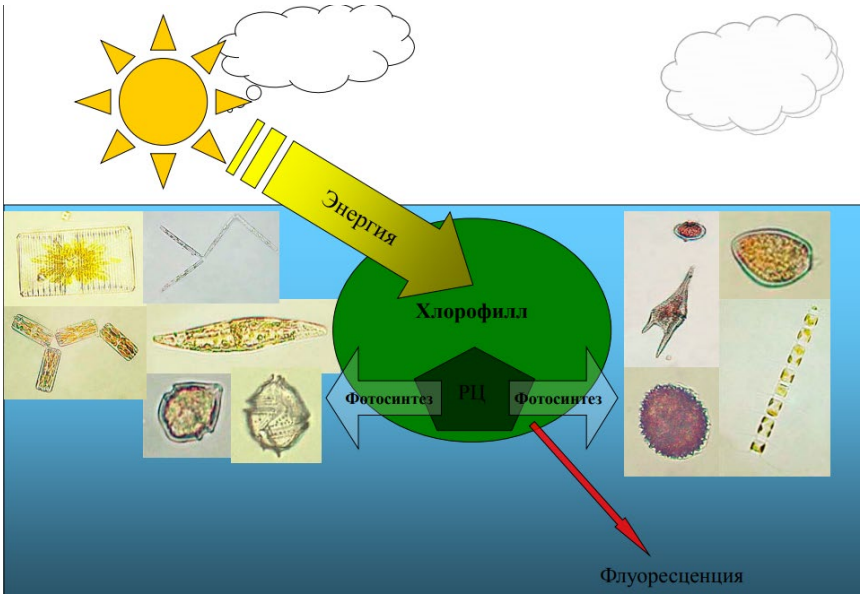


Рисунок 3.19. Схематичное изображение процесса фотосинтеза

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

При поглощении света растительными пигментами возникает люминесценция хлорофилла, т.к. хлорофилл А является самым низкоэнергетическим пигментом в данной системе (рис.3.19). В бактериальном фотосинтезе – это бактериохлорофилл.
Пути потери световой энергии хлорофиллом:

1. В тепло с константой k_d
2. Во флуоресценцию с константой k_f
3. На фотохимический перенос электрона с константой k_p

Фотохимическое тушение (фотохимический перенос электрона) – перенос электрона с молекулы хлорофилла реакционного центра на первичный акцептор.
Квантовый выход (3.3) и время жизни (3.4) флуоресценции хлорофилла описываются формулами:

$$\eta = \frac{k_f}{k_f+k_d+k_p} \qquad (3.3)$$

$$\tau = \frac{1}{k_f+k_d+k_p} \qquad (3.4)$$

В условиях эффективного фотосинтеза наблюдается короткое время жизни возбужденного состояния за счет мощного оттока энергии во всех направлениях (главным образом – фотохимического переноса) и маленький квантовый выход (1,5-2%).
В случае остановки фотосинтеза, когда перенос электрона от возбужденного хлорофилла на Qa^- невозможен – $k_p = 0$ и $\eta = \frac{k_f}{k_f+k_d}$.

Вторая фотосистема имеет существенной больший квантовый выход (≈ в 10раз), по сравнению с первой, что делает ее центральным объектом при изучении люминесценции хлорофилла (рис.3.20).

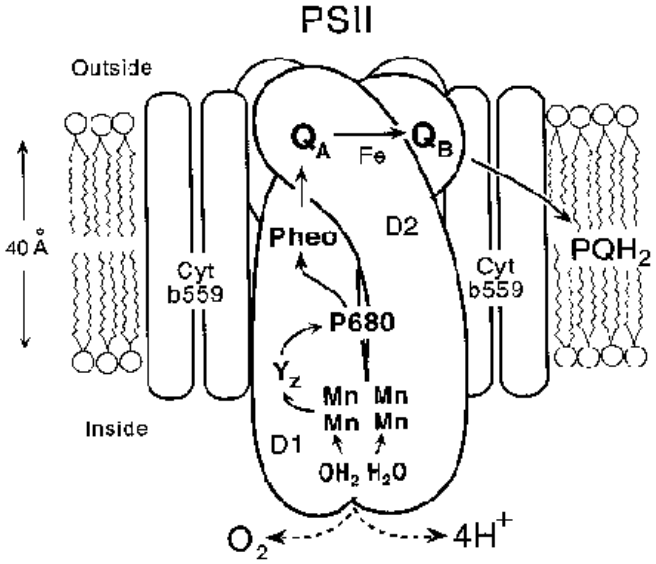


Рисунок 3.20. Схема миграции элергии в фотосистеме 2.

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

Этапы фотосинтеза на примере ФС2:

1. На антенне хлорофилла появляется возбужденное состояние
2. Экситон с антенны переходит на P680 (100 пс)
3. Электрон с P680 переносится на первичный акцептор (3 пс)
4. С первично акцептора электрон переходит на Qa (200 пс)
5. Далее происходит перенос по цепи хиноновых акцепторов (200 мкс)
6. В это время электрон от системы разложения воды, через молекулу Z (Тирозин), идет на восстановление P680.

В скобках указана примерная длительность каждого процесса.

Из-за разницы в скоростях разных этапов возможна ситуация, когда электрон еще не покинул Qa (реакционный центр закрыт), а на первичный акцептор успел прийти новый. Тогда начинается обратный перенос этого электрона на хлорофилл антенного комплекса, который с некоторой вероятностью может испустить квант света (F_v). Флуоресценция, с небольшим выходом, может происходить и при открытых реакционных центрах, и тогда она обозначается как F_0 и имеет на порядок меньшее время (200 пс против 2 нс при Fv).

Воздействие насыщающего света на объект приводит к постепенному закрытию реакционных центров (рис. 3.21). Разница в интенсивности флуоресценции между максимальным и нулевым уровнями соответствует отключению фотохимического потока. Отсюда мы можем узнать, какая часть энергии уходила на фотосинтез, его эффективность.

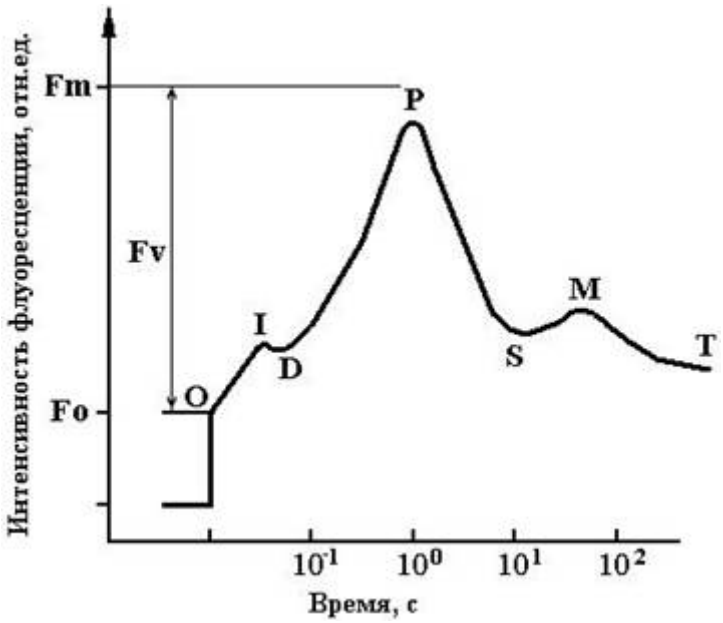


Рисунок 3.21. Кривая изменение интенсивности флуоресценции во времени при воздействии насыщающего света.

Для определения основных параметров флуоресценции хлорофилла широко применяются PAM-флуорометры (от англ. Pulse Amplitude Modulation), способные проводить OJIP-тесты (рис. 3.22). В ходе данных тестов объект облучается короткими импульсами света с интервалами времени порядка четверти секунды. За это время реакционные центры не успевают закрываться, и мы получаем значение интенсивности

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

F_0. После этого объект облучается непрерывным светом длительности примерно 1,5 с, который приводит к тому, что на кривой индукции появляется характерная OJIP-кривая, на которой находится точка F_m. Соотношение $(F_m - F_0)/F_m$ – безразмерная величина, являющаяся коэффициентом полезного действия фотосинтеза.

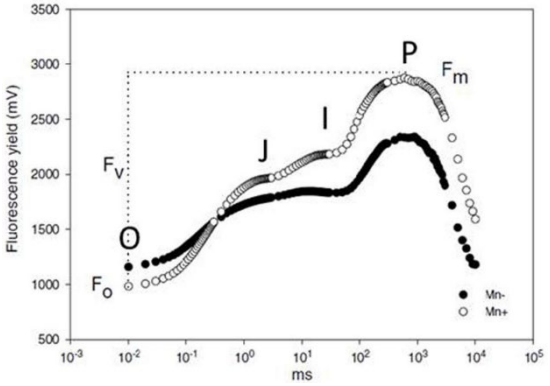


Рисунок 3.22. Пример OJIP-кривой

Данный метод, кроме широкого применения в физиологии растений, может применяться для флуоресцентного зондирования при помощи погружаемого зонда для измерения флуоресценции фитопланктона (рис. 3.23). С его помощью по абсолютному значению флуоресценции можно выяснить сколько фитопланктона находится на разных глубинах, а также определить эффективность фотосинтеза. На данный момент существуют роботизированные системы, способные производить мониторинг при помощи данного метода самостоятельно ориентируясь по датчикам GPS.

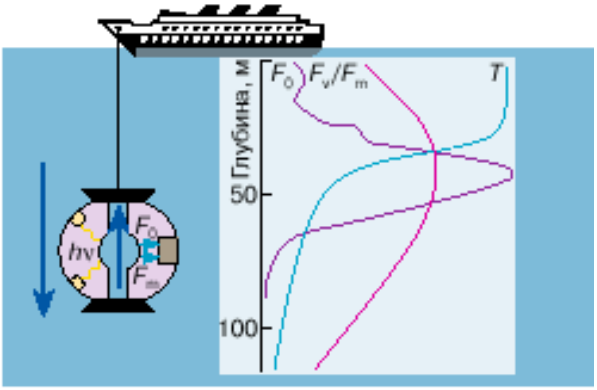


Рисунок 3.223. Схема морского зондирования фитопланктона с использованием погружного двухимпульсного флуориметра.

Из приведенного графика видно, что наибольшее количество и активность клеток наблюдается на глубине 50м. В поверхностных слоях фотосинтез угнетается из-за слишком больших интенсивностей солнечного света. Данные графики позволяют определять стадию цветения водорослей. Так, если F_0 мала, а F_v/F_m велика, то это говорит о том, что будет происходить интенсивное развитие фитопланктона, и наоборот.

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

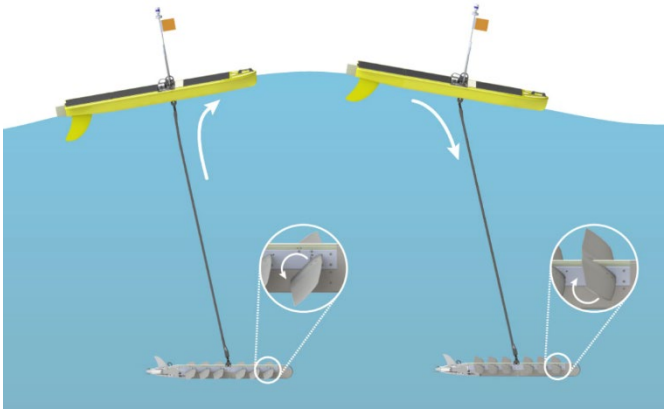


Рисунок 3.23. Принцип работы автономного поплавкового глайдера Wave Gliderторинга

Лидары – системы, способные издалека при помощи лазерного импульса возбудить люминесценцию в водной среде, а затем, соответствующим телескопом, поймать это излучение и определить его спектр (рис. 3.25). Это удобно, т.к. в полученных спектрах значения флуоресценции можно нормировать на комбинационное рассеяние света на валентных колебаниях ОН групп воды. С их помощью можно определять состояние фотосинтетического аппарата с кораблей, самолетов или береговой линии.

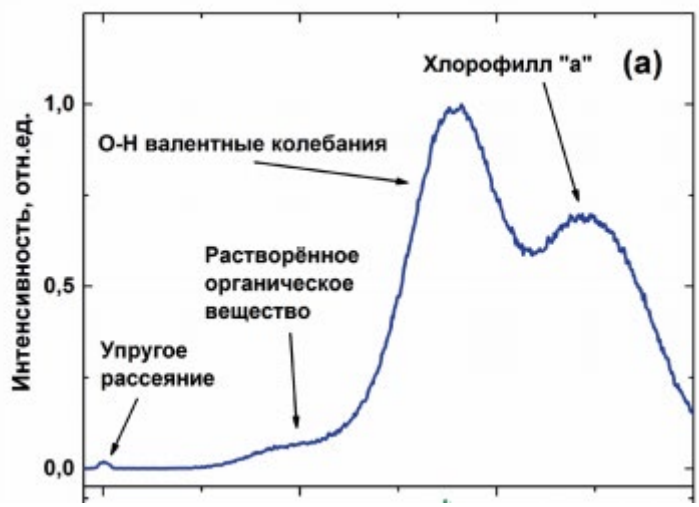


Рисунок 3.24. Пример спектра, полученного при помощи лидарного зондирования

Хемилюминесценция

Хемилюминесценция – люминесценция тел, вызванная протеканием химической реакции.

Существует механизм хемилюминесценции, характерный, чаще всего, для окисления липидов (рис. 3.26).

$$LOO\cdot + LOO\cdot \rightarrow LOH + L{=}O^* + O_2$$

$$L{=}O^* \rightarrow L{=}O + hn_1 \text{ (слабое свечение; } j = 10^{-4})$$

$$L{=}O^* + A \rightarrow L{=}O + A^* \text{ (перенос энергии)}$$

$$A^* \rightarrow A + hn_A \text{ (яркое свечение; } j = 10^{-2} - 10^{-1})$$

Рисунок 3.25. Механизм хемилюминесценции, харпктерный для липидов.

Хемилюминесценция люминола с участием перекиси водорода (рис. 3.26). Она имеет довольно высокий квантовый выход. Его используют для освещения в случаях, когда использование фонарей невозможно, например, в шахтах, в которых произошел выброс метана. Эта реакция примечательна тем, что с помощью нее можно определить количество перекиси водорода в системе с точностью до 10^{-16} моля. Кроме того, в этой реакции должны принимать участия ионы переменной валентности, которые должны разлагать перекись водорода, что позволяет использовать эту реакцию для измерения загрязненности объектов ионами переменной валентности (до 10^{-14} моля).

Биолюминесценция

Самый интересный пример – светлячки, обладающие ферментом люциферазой, катализирующей превращение молекул люциферинов (рис. 3.27). В этой реакции биолюминесценции используется АТФ, что позволяет использовать эту реакцию для измерения кол-ва АТФ в системе с точностью до 10^{-19} моля. Высокая чувствительность этого метода связана с тем, что квантовая эффективность данного процесса очень высока (более 80%, больше, чем у любого светодиода).

$$E{+}LH_2 + ATP \rightarrow E\text{-}LH_2\text{-}AMP + PP$$

$$E\text{-}LH_2\text{-}AMP \xrightarrow{+O_2;\ -CO_2} P^*\text{-}E\text{-}AMP \rightarrow E + P + AMP + \text{фотон}$$

Рисунок 3.26. Механизм люциферазной реакции. LH_2 – люциферин, PP – пирофосфат, E -люцифераза, P и P - оксилюциферин в основном и возбужденном состоянии соответственно.*

Данный метод использовался США для поиска жизни на Луне.

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

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

Реакции бактериологической биолюминесценции (рис. 3.28) менее эффективна. Однако ее изначальное назначение заключалась в удалении кислорода из системы древними анаэробами. В настоящий момент эта система используется как биотест на токсичность.

$$\text{ФМН-}H_2 + \text{E} + O_2 \rightarrow \text{E-ФМН-}H_2\text{-OOH} \xrightarrow{+\text{RCHO}}$$

$$\text{RCHO-E-ФМН-}H_2\text{-OOH} \rightarrow \text{RCOOH} + \text{E-ФМН-HOH}^* \rightarrow$$

$$\text{RCOOH} + \text{E} + \text{ФМН} + H_2O + \text{фотон (490 НМ)}$$

Рисунок 3.27. Механизм бактериальной биолюминесценции. Здесь E - люцифераза, -OOH - гидроперекисная группа, RCOOH - алифатический альдегид, RCOOH - жирная кислота. образующаяся при окислении альдегида

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

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

Лекция 3

Классическая термодинамика

Первый закон термодинамики:
Если система получила энергию в виде тепла, то происходит изменение внутренней энергии и работа против сил внешнего давления (в случае газов) (7.1).

$$\delta Q = dU + pdV \qquad (7.1)$$

Пример: газ изотермически расширяется, при этом совершает работу – расширяется (напр., толкает поршень). Это происходит за счет изменения внутренней энергии.
Второй закон термодинамики:
В изолированной системе самопроизвольные процессы идут до достижения равновесия и при этом энтропия принимает максимальные значения.

$$dS \geq \delta Q/T \quad (7.2)$$

Энтропия – функция состояния. Изменяется, т.к. при том же кол-ве молекул газа, они могут приобретать больше свободы и движения.

Когда первый закон термодинамики начал использоваться для описания химических реакций в газовой фазе, стало понятно, что в системе может совершаться так называемая химическая работа. После чего уравнение приняло вид (7.3):

$$\delta Q = dU + pdV + \delta A_{max} \quad (7.3)$$

Рассмотрим биологический пример применения первого закона термодинамики (рис. 7.1). Питательные вещества поступают в клетку, где подвергаются биохимическим

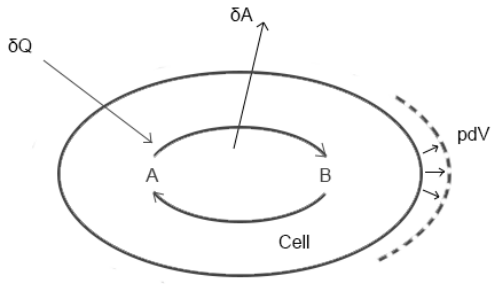


Рисунок 7.1. Схематическое изображение выполнения первого закона термодинамики в условиях биологической клетки

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

превращениям. Она может расширяться, однако, это слабо характерно для клеток. В основном в ней совершается химическая работа (δA).

Как правило, классическая термадинамика комбинирует первый и второй законы и вводит термодинамические функции: полный термодинамический потенциал Гиббса G (7.4) и свободная энергия F (7.5). Взяв полный дифференциал этих функций (7.6 и 7.7), можно найти химическую работу.

$G(p,T) = U - TS + pV$ (7.4)

$F(V,T) = U - TS$ (7.5)

$dG = -SdT + pdV - \delta A'max$ (7.6)

$dF = -SdT - pdV - \delta A'max$ (7.7)

Как правило, расширение клетки несущественно, отсюда получаем, что для нее выполняется условие $p\Delta V \approx 0$. Отсюда получаем, что для клетки $\Delta G \approx \Delta F$. Тогда справедливы равенства 7.8 и 7.9.

$(dG)_{p,T} = -\delta A'max$ (7.8)

$(dF)_{V,T} = -\delta A'max$ (7.9)

Протекание реакций связано с понятием химического потенциала μ (7.10). Вывод формулы представлен на рис.7.2.

$\mu = \mu^0 + RTlnC$ (7.10)

Рассмотрим простой пример обменной реакции:

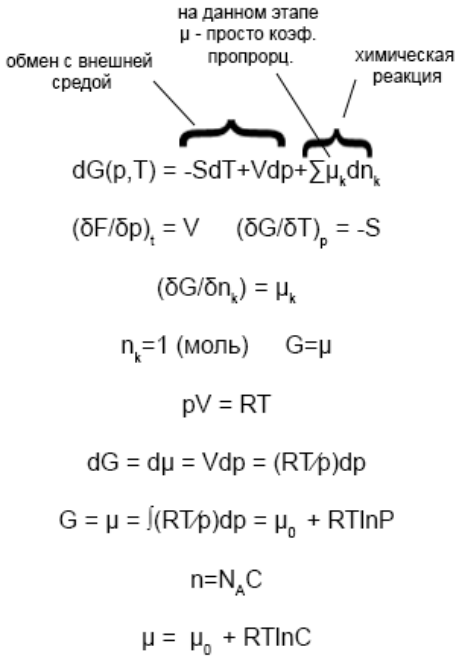


Рисунок 7.2. Вывод формулы термодинамического потенциала

$\nu_1 C_1 + \nu_2 C_2 \leftrightarrow \nu'_1 C'_1 + \nu'_2 C'_2$

В этой системе не изменяется кол-во атомов. Однако, в ней может меняться кол-во частиц. ν, в данном примере, пропорционально числу молей, которые принимают участие в реакции.

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

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

В 1 моле содержится количество молекул, равное числу Авогадро (N_A). С помощью данной константы можно определить количество молекул, зная концентрацию (7.11), и узнать массу одного моля вещества (7.12).

$n_c = N_a C$ (7.11)

$a_H M_{мв} N_a = M_г$ (7.12),

где a_H – масса одного водорода в граммах

$M_{мв}$ *- молекулярный вес атома кислорода*

N_a*- число Авогадро*

Рассмотреть описанную выше реакцию можно, представив человечков, перетягивающих канат. При приложении законов классической термодинамики, если на одной стороне будет в два раза больше людей, эта сторона окажется сильнее в ln2 раз.

Уравнение Аррениуса (7.13):

$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$ (7.13),

где kΔ – константа скорости реакции,

A – предэкспоненциальный множитель, показывающий общее число столкновений,

E_a – энергия активации, T – температура в K, R – молярная гаховая постоянная

Рассмотрим далее на примере реакции: $C_1 \leftrightarrow C_2$

При установлении равновесия этой обратимой реакции, скорость прямой реакции (k_1C_1) должна сравняться со скоростью обратной реакции (k_2C_2), где k_1 и k_2 – константs скорости прямой и обратной реакций, соответственно (7.14). На основании это можно сформулировать еще одно важное равенство (7.15). Их него следует, что отношение равновесных концентраций обратно пропорционально отношению соответствующих скоростей.

$k_1 C_1 = k_2 C_2$ (7.14)

$K = \frac{C_2}{C_1} = \frac{k_1}{k_2}$ (7.15)

Причина различия констант прямой и обраной реакций кроется в различии энергий энергетических барьеров для каждой из них (рис. 7.3). Из формул 7.13 и 7.15 можно вывести формулу, связывающую константу равновесия с энергиями акцивации прямой и обратной реакции (7.16).

$K = \frac{k_1}{k_2} = e^{\frac{-(\Delta E_2 - \Delta E_1)}{RT}} = e^{\frac{-(\Delta U)}{RT}}$ (7.16),

где ΔU – тепловой эффект реакции.

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

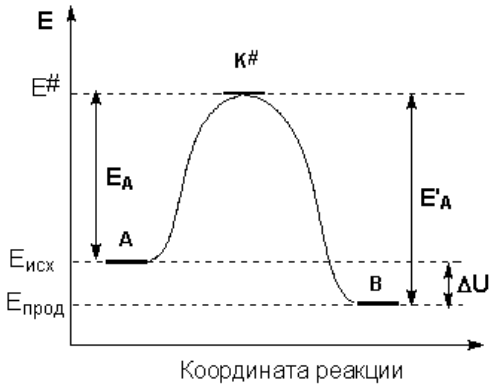


Рисунок 7.3. Энергетическая диаграмма химической реакции

$$АТФ \rightleftharpoons АДФ + H_3PO_4 + Q$$

Рисунок 7.4. Реакция гидролиза АТФ

Если рассмотреть на примере реакции гидролиза АТФ (рис. 7.4), то изменеие внутренней энергии будет заключаться в образовании новых молекулярных связей.

Одно из самых важных достижений классической термодинкамики – возможность узнать химическую работу, не зная конкретного молекулярного механизма связанного с конкретными молекулярными превращениями, сопровождающими изменение внутренней энергии.

Теперь мы можем найти изменения dG при постоянных p и T из формулы 7.6, и это будет равняться нашей химической работе. В случае примера $C_1 \leftrightarrow C_2$, где все начальный концентрации переходят в равновесные: $C^0_1 \rightarrow C^{eq}_1$. Можно провести аналогию с разными уровнями воды (рис. 7.5). Химический потенциал начального и конечного состояний будет соответствовать в данном примере уровню воды. В процессе реакции уровень воды понижается.

Разница ΔG, связаная только с химической реакцией при постоянных p и T, есть сумма вкладов химических потенциалов всех реагентов (7.17). В примере $C_1 \rightarrow C_2$, химический потенциал первого компонента (C_1) - μ_1, будет отрицательным, т.к. происходит уменьшение его кол-ва и, соответственно, μ_2 будет положительным.

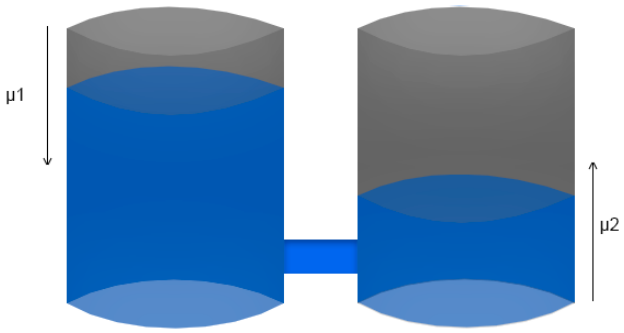


Рисунок 7.5. Иллюстрация к аналогии с уровнями воды

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

$\Delta G = \sum \nu_i \mu_i = -\mu_1 + \mu_2 = -\delta A'max$ (7.17)

Теперь подставляем μ_1 и μ_2 из 7.10:

$\Delta G = \sum \nu_i \mu_i = \mu_2^0 - \mu_1^0 + RTln\frac{C_2^0}{C_1^0}$ (7.18)

где C_1^0 и C_2^0 – начальные концентрации.

$\mu_2^0 - \mu_1^0 = \Delta G_0$, тогда

$$\Delta G = \Delta G_0 + RTln\frac{C_2^0}{C_1^0} \quad (7.19)$$

В момент окончания реакции, скорость прямой и обратной реакций уравнялись и концентрации веществ равны своим равновесным концентрациям. В этом состоянии $\Delta G = 0$. Тогда выполняется следующее равенство:

$$\Delta G_0 = -RTln\frac{C_2'}{C_1'} = RTlnK \quad (7.20),$$

где C_1' и C_2' - равновесные концентрации веществ в реакции,
K – константа равновесия.

ΔG_0 можно найти, взяв одинаковые начальные концентрации веществ.

Рассмотрим различные случаи:

1. $\Delta G_0 < 0 \Rightarrow K < 1 \Rightarrow C_2' > C_1'$
   $\mu_2^0 - \mu_1^0 < 0 \Rightarrow \mu_2^0 < \mu_1^0$ – идет спонтанная прямая реакция и уменьшение исходного термодинамического потенциала
2. $\Delta G_0 > 0 \Rightarrow K > 1 \Rightarrow C_2' < C_1'$
   $\mu_2^0 - \mu_1^0 > 0 \Rightarrow \mu_2^0 > \mu_1^0$ – реакция идет против термодинамического потенциала и возможна, например, в случае сопряжения реакций.

Пример сопряженной реакции – гидролиз АТФ. В этой реакции ΔG = -7 ккал/м. Глядя в биохимический справочник, можно, посмотрев на ΔG интересуемой реакции, сказать, может ли она быть сопряжена с гидролизом АТФ.

Окислительно-восстановительный потенциал

Редокс-потенциал зависит от валентности и от окружения. Так, свободное железо имеет потенциал отличный от железа в составе цитохрома (табл. 2).

Fe^{3+} / Fe^{2+}	+0,77
Fe^{3+} / Fe^{2+} - гем	-0,23
Fe^{3+} / Fe^{2+} - цитохром b	-0,04
Fe^{3+} / Fe^{2+} - цитохром c	+0,26
Fe^{3+} / Fe^{2+} - цитохром a	+0,29

Таблица 2. Редокс потенциалы железа при различном окружении иона

Термодинамика позволяет по соотношению равновесных концентраций оценить энергетический эффект. Для реакции гидролиза АТФ получится соотношение:

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

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[ADP][P]}{[ATP]} \qquad (7.20)$$

Соединение кинетики и термодинамики

Задача биофизики – посмотреть состояние, находящееся между начальным состоянием и равновесным.

Первый постулат:

все переменные: хим. потенциал, концентрация, химическая работа – зависят от времени.

Задачи:

1. Трансформация энергии в каждый момент времени, сопряжение реакций
2. Применение второго закона в биологии, имеет ли он предсказательную силу.

Если взять изолированную систему клеток и посмотреть на изменение энтропии, то окажется, что никакой дезорганизации не происходит, клетки продолжают размножаться, что говорит о кажущемся нарушении второго закона.

В классической термодинамике, в обратимых процессах изменение энтропии равняется приведенной теплоте. А в необратимых – больше, чем приведенная теплота, т.к. необратимые процессы в системе идут с выделением тепла.

Основной постулат термодинамики необратимых процессов связан с тем, что мы мысленно делим изменение энтропии на две части: на обмен с внешней средой и внутренние необратимые процессы.

Возвращаясь к идее о том, что биологические системы способны «самопроизвольно» повышать свою организацию и, соответственно, уменьшать энтропию, можно сделать вывод о том, что они «питаются отрицательной энтропией». Это кажущееся противоречие второму закону - в процессе гидролиза питательных веществ биологические системы запасают энергию.

Рассмотрим запасание энтропии в планетарном масштабе:

1. На Солнце идут реакции с колоссальным увеличением энтропии.
2. Энергия Солнца в виде квантов света на лист. Этот процесс соответствует уменьшению энтропии лист, т.к. свободная энергия, которую несут кванты, есть U – TS. Если внутренняя энергия сохраняется (dU=0), то происходит уменьшение энтропии.
3. Возбужденный квантом света электрон проходит по ЭТЦ фотосинтеза с постепенным увеличением энтропии
4. Выделенная энергия запасается в виде АТФ

Как мы помним, энтропию можно разделить на две части:

$dS = d_eS + d_iS$ *(7.21),*

где S_e – изменение энтропии при обмене с внешней средой,

dS_i – энтропия, потраченная на внутренние процессы

Продифференцировав по времени формулу (7.21) получим:

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

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d_e S}{dt} + \frac{dS_i}{dt} \qquad (7.22)$$

Тогда возможны три различных результата:

1. $\frac{d_e S}{dt} < 0 \quad \left|\frac{d_e S}{dt}\right| > \frac{d_i S}{dt}$ – рост, увеличение степени организации
2. $\frac{d_e S}{dt} < 0 \quad \left|\frac{d_e S}{dt}\right| < \frac{d_i S}{dt}$ – голодание
3. $\frac{d_e S}{dt} < 0 \quad \left|\frac{d_e S}{dt}\right| = \frac{d_i S}{dt}$ – стационарное состояние

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

Лекция 4

Электрохимический потенциал и электродиффузия

Полная формула электрохимического потенциала:

$\mu = \mu^0 + RTlnC + zF\varphi$ (8.1),

где z – заряд иона, F – число Фарадея,

φ – потенциал в газовой фазе

Представим, что у нас есть два объема, соединенные между собой, и вещество А, имеющее разную концентрацию в этих объемах (рис. 8.1). Нас будет интересовать создаваемая разность потенциалов. Эту задачу можно задать и в обратном порядке – выяснить распределение концентрации в объемах при заданной разности потенциалов.

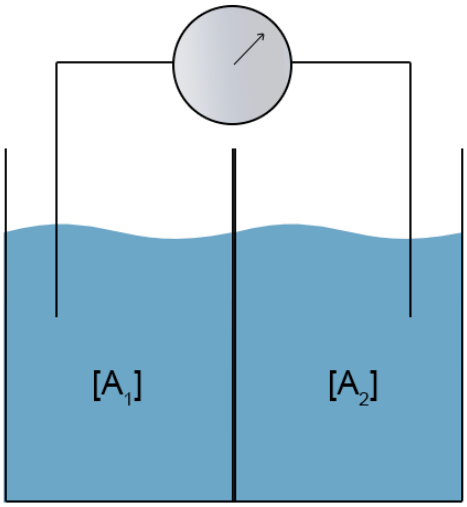


Рисунок 8.1. Схема описываемой электролитической ячейки.

В случае равновесия, электрохимические потенциалы в ячейках будут равны: $\mu_1 = \mu_2$. Тогда справедливы равенства:

$RTlnC_1 + zF\varphi_1 = RTlnC_2 + zF\varphi_2$ (8.2)

$zF(\varphi_1 - \varphi_2) = RTln\frac{C_2}{C_1}$ (8.3)

В равенстве 27 обозначим разность потенциалов как Δφ и перенесем остальные переменные в правую часть:

$\Delta\varphi_1 = \frac{RT}{zF} ln\frac{C_2}{C_1}$ (8.4)

В случаях, когда равновесие еще не установилось, существует поток вещества, пропорциональный концентрации. Кроме того, у разных веществ имеется своя подвижность, которая определяется, к примеру, радиусом частиц. Также, есть составляющая, заставляющая частицы двигаться – градиент электрохимического

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

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

потенциала (или градиент химического потенциала, если частицы не несут заряд). Таким образом, поток определяется формулой:

$$J = Cu\left(-\frac{dM}{dx}\right) \qquad (8.5),$$

где C – концентрация в-ва, u – подвижность,
$\frac{dM}{dx}$ *– градиент электрохимического потенциала.*

Вернемся в функции 8.1 и продифференцируем ее по x:

$$\frac{d\mu}{dx} = RT\frac{1}{C}\frac{dC}{dx} + zF\frac{d\varphi}{dx} \qquad (8.6)$$

Теперь подставив полученное выражение в 8.5, получим уравнение Нернста-Планка:

$$-J = uRT\frac{dC}{dx} + uczF\frac{d\varphi}{dx} \qquad (8.7)$$

Если рассматривать диффузию незаряженных веществ, то из уравнения Нернста-Планка можно получить закон Фика:

$$-J = uRT\frac{dC}{dx} \qquad (8.8)$$

Кроме того, запись закона Фика можно сократить, введя коэф. диффузии D = uRT, тогда закон Фика принимает вид:

$$-J = D\frac{dC}{dx} \quad (8.9)$$

К уравнению Нерста-Планка могут применяться различные сокращения. Одно из них – упрощение Гендерсона, которое заключается в предположении, что все фазы электронейтральны и концентрации положительных и отрицательных ионов равны между собой. В состоянии равновесия, суммарные потоки катионов и анионов равны между собой, но противоположны по знаку. Тогда справедливы равенства:

$$u_+RT\frac{dC}{dx} + u_+czF\frac{d\varphi}{dx} = u_-RT\frac{dC}{dx} - u_-czF\frac{d\varphi}{dx}$$

$$czF\frac{d\varphi}{dx}(u_+ + u_-) = RT\frac{dC}{dx}(u_+ - u_-)$$

$$\frac{d\varphi}{dx} = \frac{RT}{zF}\frac{1}{\mathrm{C}}\frac{dC}{dx}\frac{(u_+ - u_-)}{(u_+ + u_-)} \qquad (8.10)$$

Проинтегрировав, получим:

$$\Delta\varphi = \frac{(u_+ - u_-)}{(u_+ + u_-)}\frac{RT}{zF}ln\frac{C_2}{C_1} \qquad (8.11)$$

Можно проиллюстрировать работу данного закона на опыте. Если взять NaCl и налить его раствор в две фазы, разделенные мембраной, таким образом, чтобы концентрация соли в одной из фаз была выше, чем в другой, то между фазами возникнет разность потенциалов. Этот эффект связан с тем, что ионы имеют разную подвижность – Cl имеет меньший радиус и быстрее двигается.

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

Соотношение Уссинга. Выполнение данного соотношения является критерием независимости потоков и пассивного транспорта. Рассмотрим его на примере электролитической ячейки с двумя фазами (рис. 8.2). Допустим, что между фазами есть независимые потоки J_1 и J_2. Тогда поток J_1 будет пропорционален концентрации вещества в фазе 1, а поток J_2 - пропорционален концентрации в фазе 2:

$J_n = k_n C_n$ (8.12),

где n – обозначение фазы, C_n – концентрация вещества в фазе n,
J_n – поток вещества из фазы n, k_n – коэффициент пропорциональности

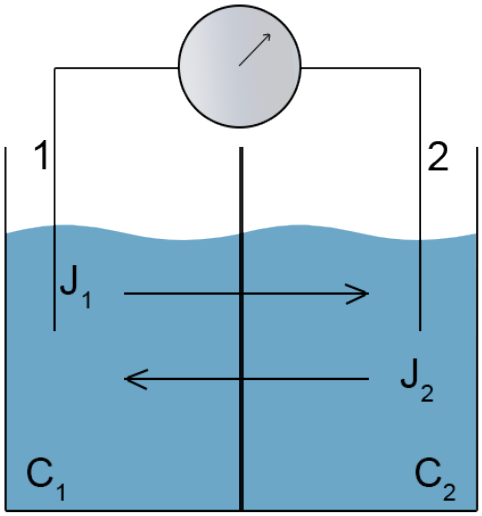


Рисунок 8.2. Ячейка с двумя фазами и независимыми потоками между ними

Таким образом, чем больше вещества в фазе, тем больше поток этого вещества через раздел фаз. Концентрации C_1 в этом примере будет соответствовать некая абстрактная равновесная концентрация C_2 (обозначим её как C_2^*).

Отношение потоков J_1 и J_2 расчитывается из уравнения Нернста (8.7):

$$\Delta\varphi_1 = \frac{RT}{zF} ln \frac{C_2^*}{C_1} \quad (8.13)$$

$$C_2^* = C_1 e^{\frac{zF\Delta\varphi}{RT}} \quad (8.14)$$

Из уравнения 8.14 следует:

$J_2^* = k_2 C_2^*$ (8.15)

Тогда, в случае равновесия, когда потоки равны, будут верны равенства:

$J_2^* = J_1$

$k_2 C_2^* = k_1 C_1$ (8.16)

В рассматриваемом случае нет равновесия, поэтому мы выразим полученную нами k_2 из равенства 37, содержащего нашу введенную равновесную концентрацию C_2^*. Теперь выразим отношение потоков через начальные концентрации:

$$\frac{J_1}{J_2} = \frac{k_1 C_1}{k_2 C_2} \quad (8.17)$$

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

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

Подставляем в уравнение 8.17 k_2, выразив его из равенства 8.16. k_1 и C_1 сокращаются и получаем следующее равенство:

$$\frac{J_1}{J_2} = \frac{C_2^*}{C_2} \qquad (8.18)$$

Подставляем в 8.18 вместо C_2^* выражение, полученное в уравнении 8.14. После подстановки получаем соотношение Уссинга:

$$\frac{J_1}{J_2} = \frac{C_1}{C_2} e^{\frac{zF\Delta\varphi}{RT}} \qquad (8.19)$$

Соотношение Уссинга является хорошим критерием для определения пассивности транспорта через мембрану.

Однако, описанные выше соотношения не могут охарактеризовать способ и скорость переноса вещества через мембрану. Различные вещества имеют разную способность проходить через мембрану. Это зависит от размера молекулы и ее гидрофильности. Так, например, сахар плохо проникает через мембрану, что послужило поводом для появления белка, производящего его облегченную диффузию (рис. 8.3). Эти белки снижают потенциальный барьер переноса из одной стороны мембраны в другую. Белков переносчиков чрезвычайно много, они составляют целое семейство мембранный белков. Важно отметить, что облегченная диффузия – это пассивный процесс, не позволяющий создавать градиент концентрации, но ее можно рассматривать как ферментативную реакцию, подчиняющуюся кинетике Михаэлиса-Ментен. Так, начальные стадии потока можно описать уравнением Михаэлиса:

$$J = \frac{J_{max}[S]}{K_m + [S]} \qquad (41)$$

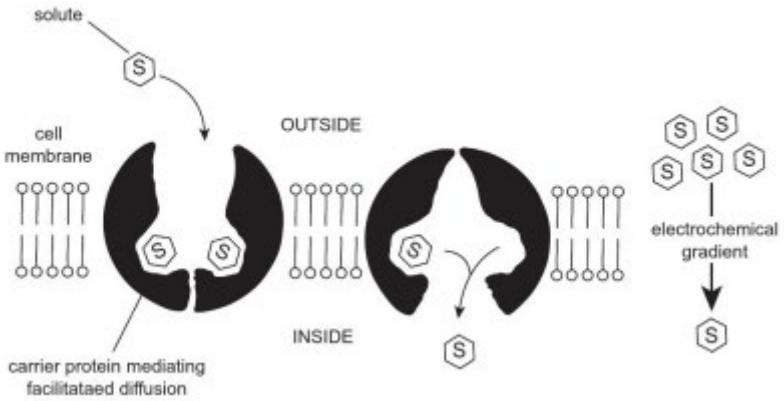


Рисунок 8.3. Модель облегченного транспорта глюкозы

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

Как и на любую ферментативную реакцию – на облегченную диффузию можно влиять конкурентными и неконкурентными ингибиторами (рис. 8.4). Если ингибитор конкурентный, то он связывается с тем же сайтом, что и субстрат, т.е. фактически, кажущаяся константа Михаэлиса будет смещаться вправо и фермент будет казаться менее аффинным к субстрату, чем должен быть. С другой стороны, неконкурентное ингибирование практически не изменяет концентрацию доступного фермента, но влияет на V_{max}.

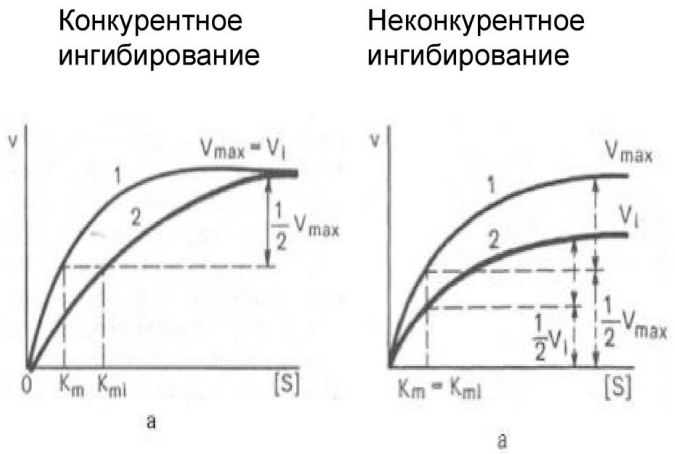


Рисунок 8.4. Примеры влияния ингибиторов на ферментативную кинетику белка

Пример: семейство переносчиков моносахаров. Это представители суперсемейства MFS, включающего унипортеры (SLC), симпортеры (SLGT) и антипортеры (обычно сахар:H^+ или сахар:Na^+). Большинство из переносчиков моносахаров – относительно крупные белки, имеющие 12 трансмембранных доменов, причем фактически состоящие из двух половинок которые, разворачиваясь, образуют «боченочек» в мембране. Есть мнение, что эти переносчики образовались путем дупликации одного гена.

Когда глюкоза попадает внутрь клетки, она практически сразу фосфорилируется и сиановится недоступна для переносчика, что сдвигает константу реакции в сторону переноса глюкозы внутрь.

Количество переносчиков глюкозы в клетке непостоянно. Обычно, в состоянии покоя, их не очень много, однако, под действием инсулина происходит слияние визикул,

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

несущих переносчики глюкозы, с мембраной клетки (рис. 8.5). Нарушение данного процесса может приводить к диабету.

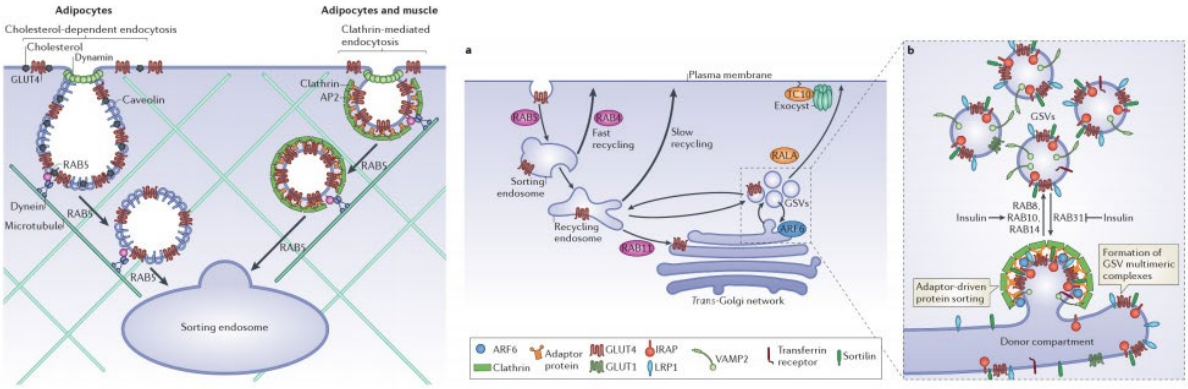


Рисунок 8.5. Встраивание GLUT4 в мембрану, регулируемое инсулином

Моделирование структуры переносчика GLUT1 показала наличие нескольких сайтов связывания циклической глюкозы. Исходя из этого можно предположить, что глюкоза проходи внутри канала белка, меняя свои сайты связывания.

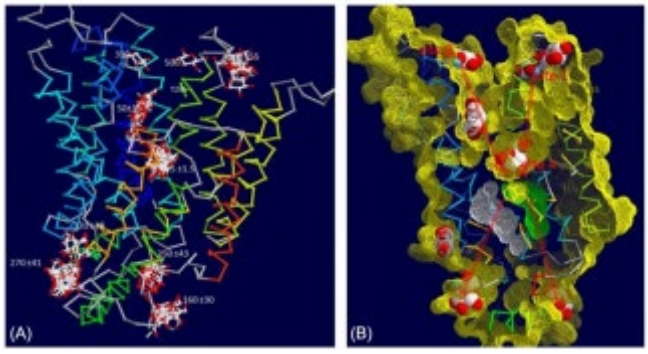


Рисунок 8.6. Предполагаемые сайты связывания глюкозы белка GLUT1

Любопытно, что переносчики сахаров обычно представлены в виде тетрамеров, и эффективность таких комплексов в два раза выше, чем суммарная эффективность двух димеров.

Аминокислоты, как и сахара, транспортируются и при облегченной диффузии, и при помощи различного рода обменников (рис. 8.7). Чаще всего, белки обменники и белки, обеспечивающие облегченную диффузию, гомологичны между собой.

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

TABLE 4.3 An Early Classification of the Amino Acid Transporters[a]

Name of System	Preferred Substrates	Sodium Requirement[b]	Example of Corresponding Gene
A	Alanine, aminoisobutyric	Yes	*SLC38A1*
ASC	Alanine, serine, cysteine, threonine	Yes	*SLC7A10*
Gly	Glycine, sarcosine	Yes	*SLC38A5*
L	Leucine, phenylalanine	No	*SLC7A5*
N	Glutamine, histidine, asparagine	Yes	*SLC38A3*
y^+	Arginine, lysine, ornithine	No	*SLC7A6*
x^-	Glutamate, aspartate	Yes	*SLC7A13*

[a]*Based largely on the work of Christensen (1984). See also http://en.wikipedia.org/wiki/Amino_acid_transporter.*
[b]*For the importance of the sodium requirement of these systems, see Chapter 5.*

Рисунок 8.7. Классификация аминокислотных транспортеров.

Свойства облегченной диффузии:

1. Переносчики — интегральные трансмембранные белки
2. Обладают специфичностью/избирательностью к субстрату (может варьировать)
3. Ингибируются физиологическими или нефизиологичными аналогами субстратов
4. Насыщение зависимости потока от концентрации субстрата, соответствующее кинетике Михаэлиса-Ментен
5. Наличие переориентации сайта связывания субстрата с одной стороны мембраны на другую

- В облегченной диффузии субстрат последовательно взаимодействует с переносчиком с одной стороны мембраны, и никогда с обеих сторон одновременно
- Изменение ориентации переносчика с одной стороны мембраны на другую происходит быстрее, если с переносчиком связан субстрат; лимитирующий процесс — реориентация свободного переносчика
- Специфичность (K_M) может быть разной по разные стороны мембраны, что соответствует разной свободной энергии переносчика по разные стороны мембраны. Однако $\frac{V_{max}}{K_M}$ должна быть постоянной. Кроме того, данная разница не приводит неравновесному состоянию, т.к. это противоречило бы термодинамике. Это связано с тем, что низкоаффинная конформация переносчика имеет более низкую свободную энергию, а значит, большую часть времени белок проводит именно в этом состоянии. При этом E_0 будет определяться тем, что V_{max} будет больше, а K_M будет уменьшаться, и наоборот для высокоаффинной конформации.

Каналы проводят ионы намного быстрее, чем переносчики, однако, не обладают такой высокой специфичностью.

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

Обмен (антипорт)

Особенность механизма обмена заключается в том, что белок-обменник производит единовременный перенос двух разных молекул в противоположных направлениях (рис. 8.8), при этом в состоянии равновесия, градиенты этих двух молекул равны. В случаях, если стехиометрия отличается, то верно равенство:

$n_A \Delta\mu_A = n_B \Delta\mu_B$ (8.20)

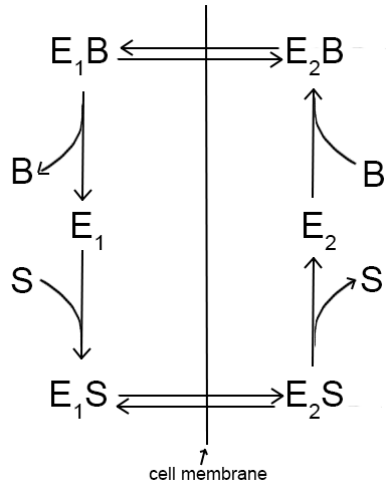


Рисунок 8.8. Кинетическая схема обменного процесса

В данной схеме E_1 и E_2 – разные конформации белка-антипортера, S и B – субстраты.
Если взять липисомы, нагруженные Na^+ и несущие на мембране Na^+/Ca^{2+} – обменник, и поместить в раствор с KCl, то внутри липосомы ионов Na^+окажется больше, чем снаружи (рис. 8.9). Из-за разницы в концетрациях, липосомы начнут накачивать внуть себя кальций. С другой стороны, если поместить липосомы в раствор NaCl, то Ca начнет выходить из липосом.

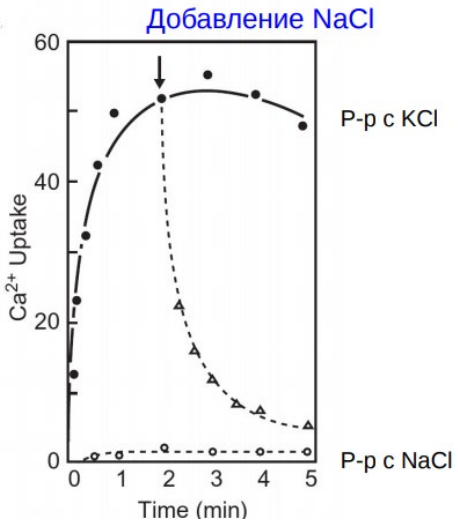


Рисунок 8.9. Эксперимент с липосомами. Кривые изменения концентрации Ca

Пример создания Ca^{2+} градиента Na^+/Ca^{2+}-обменником (рис.8.10).

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

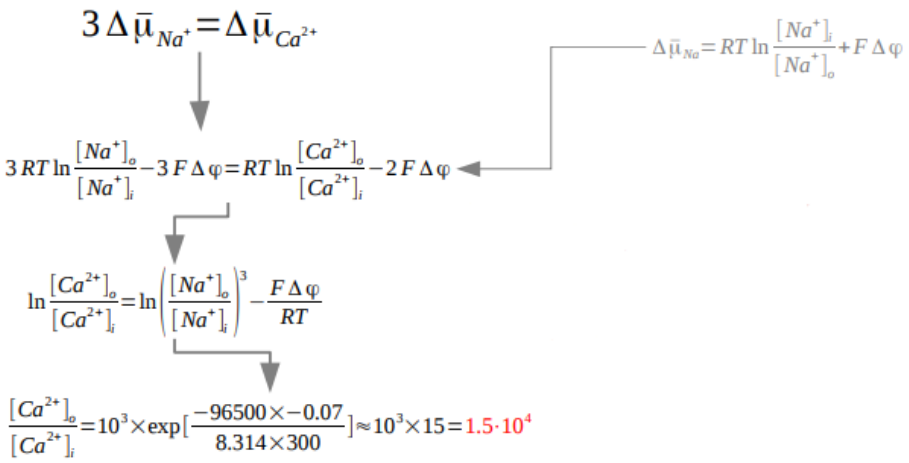


Рисунок 8.11. Расчет отношения концентраций Ca

Запишем условия равновесия и рассчитаем отношение Ca внутри и снаружи (рис. 8.11): Получим, что при 10-кратном градиенте Na^+ и трансмембранном потенциале -70 мВ, теоретический градиент по Ca^{2+}, создаваемый Na^+/Ca^{2+}-обменником, может достигать 15000.

Когда кальций проникает в клетку, то именно Na^+/Ca^{2+}-обменники обеспечивают быструю фазу выведения его из клетки, но не может обеспечивать требуемый Ca градиент (который больше 15000). Нужный градиент медленно доводится до требуемых значений за счет первичного активного транспорта (рис. 8.12).

Важно понимать, что в клетках есть ограниченное число систем активного транспорта, создающих градиент ионов за счет энергии АТФ, но существует огромное количество систем, использующих уже имеющиеся градиенты.

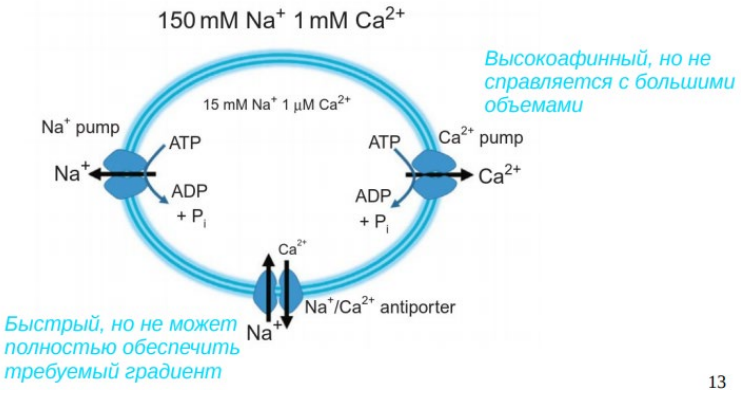


Рисунок 8.12. Участники трансмембранного переноса Ca их вклад в процесс транспорта

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

Бактериальный обменник EmrE – обеспечивает резистентность бактерий к различного рода веществам (рис. 8.13).

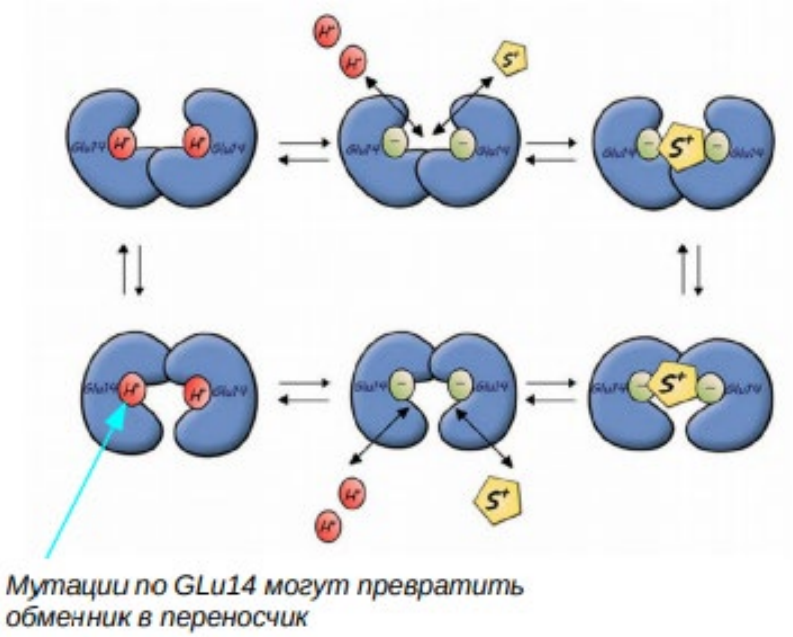


Рисунок 8.13. Механизм работы бактериального обменника EmrE

Особенности EmrE:

1. Выводит органические катионы в обмен на H+
2. Обеспечивает резистентность к лекарствам
3. Самый простой белок своего семейства, 110 амк
4. Рабочая форма — димер, каждый имеет 4 ТМ домена

EmrE имеет два сайта связывания для протонов, и один сайт связывания для вещества. Если создать электрический градиент на мембране липосомы, то транспорт двухвалентных катионов из клетки будет непотенциалчувствительным, а транспорт моновалентных катионов будет зависеть от потенциала (рис. 8.14). За счет того, что он переносит два протона, взамен на одну молекулу вещества, даже в случае, если он

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

непотенциалзависимый, он может создать 100 кратный градиент по удаляемому лекарственному веществу.

Оценка конформационных движений белковых молекул флуоресцентными методами.

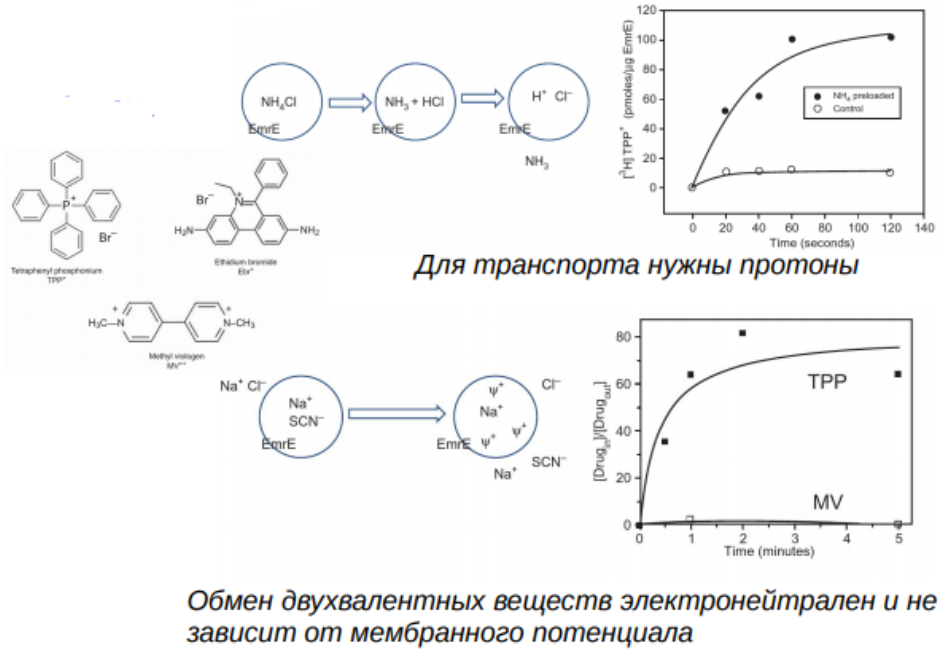


Рисунок 8.14. Потенциалзависимый и непотенциалзависимый транспорт обменником EmrE

Некоторые аминокислоты, например триптофан, способен флуоресцировать, и эта флуоресценция зависит от его окружения. При изменении окружения триптофана, в ходе конформационных изменений – меняются и свойства его флуоресценции, например квантовый выход. Так, если, например, в области активного центра у нас есть молекула триптофана, то, наблюдая за тем, как меняется его вантовый выход или время жизни возбужденного состояния, можно оценить, как меняется конформация молекул.

Так, при изучении работы Na/H – обменника, исследователи заменили весь триптофан на нефлуоресцирующие аминокислоты и фенилаланин около мест связывания заменили на триптофан. По флуоресценции полученного мутантного белка удалось сделать выводы о его рабочем цикле.

Особенности Na/H – обменника:

1. Обменивает 2H+ /Na+
2. 12 ТМ доменов
3. суперсемейство катион/протон антипортеров (CPA)
4. Nha — обменник E. coli, очень быстрый (родственные белки есть от бактерий до человека)
5. рабочая форма - димер

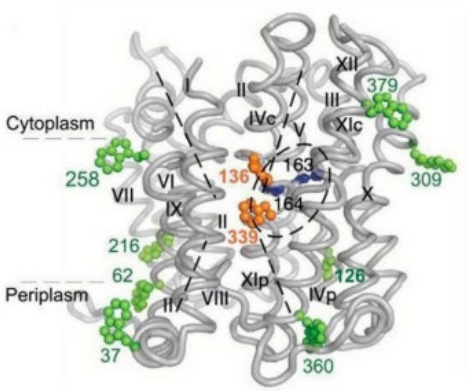


Рисунок 8.15. Строение Na/H - обменника

Симпорт (котранспорт)

Впервые данный тип транспорта исследовали на системе кишечника. Если взять кусок кишечника грызуна и сформировать из него «мешочек», то при помещении его в раствор глюкозы, она будет постепенно накапливаться внутри него, при этом, пик концентрации очень быстро произойдет в самих кишечных клетках (рис. 8.16).

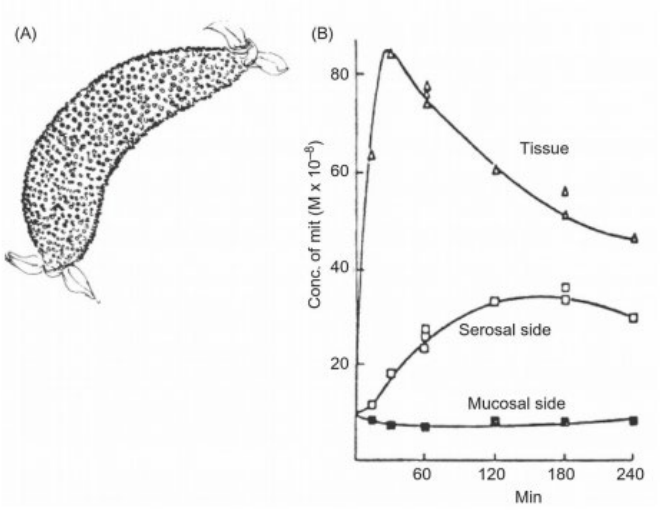


Рисунок 8.16. Эксперимент с транспортом аминокислот через стенку кишечника (модель «вывернутого мешка»).

В ходе эксперимента выяснили, что этот транспорт использует градиент натрия для переноса глюкозы. Если взять камеру, разделенную стенкой кишечника, через которую будет происходить транспорт, и добавить в один из отсеков глюкозу, то между отсеками возникнет электрический ток (рис. 8.17).

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

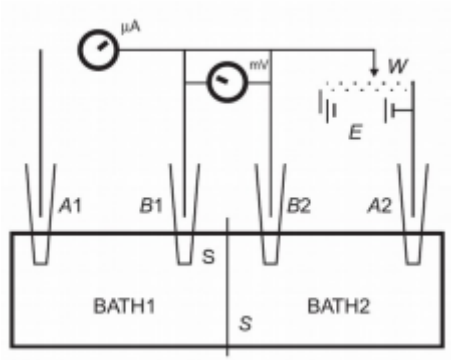


Рисунок 8.17. Изображение камеры Уссинга, описываемой в эксперименте

Суммарно, данные процесс переноса будет пассивным и, если какое-либо из веществ проводится против градиента его электрохимического потенциала, то это происходит из-за того, что существует сопряженный с ним поток другого вещества по его градиенту (рис. 8.18). Условие равновесие такого переноса будет иметь вид:

$$\Delta\bar{\mu}_s + \Delta\bar{\mu}_A = 0 \qquad (8.21)$$

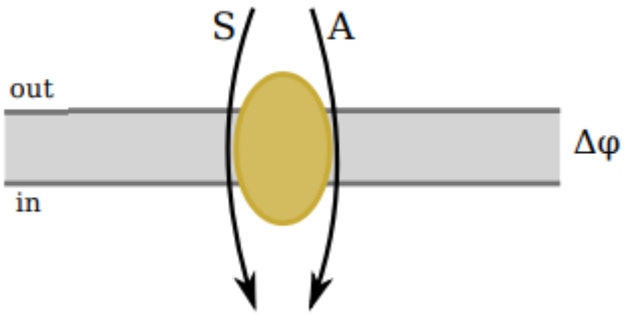


Рисунок 8.18. Схема сопряженного переноса молекул

Соотношение равновесных концентраций (транспорт неэлектролитов):

$$\left(\frac{S_o}{S_i}\right)^{n_s} = \left(\frac{A_i}{A_o}\right)^{n_a} \qquad (8.22)$$

Из условия равновесия (42), путем подстановки 26 получаем равенства:

$$RTln\frac{[S]_i}{[S]_o} = RTln\frac{[A]_o}{[A]_i} - zF\Delta\varphi$$

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{zF} ln \frac{[S]_o}{[S]_i}\frac{[A]_o}{[A]_i} \qquad (8.23)$$

Равновесный потенциал переносчика

$$ln\frac{[S]_i}{[S]_o} = RTln\frac{[A]_o}{[A]_i} - \frac{zF}{RT}\Delta\varphi \qquad (8.24)$$

Соотношение концентраций

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

Из уравнений 8.23 и 8.24 следует, что в случае Na^+-Глю котранспорта, 10-кратный градиент Na^+ и мембранный потенциал -60 мВ могут создать 100-кратный градиент глюкозы.

Для котранспортеров возможны разные кинетические схемы (рис. 8.19).

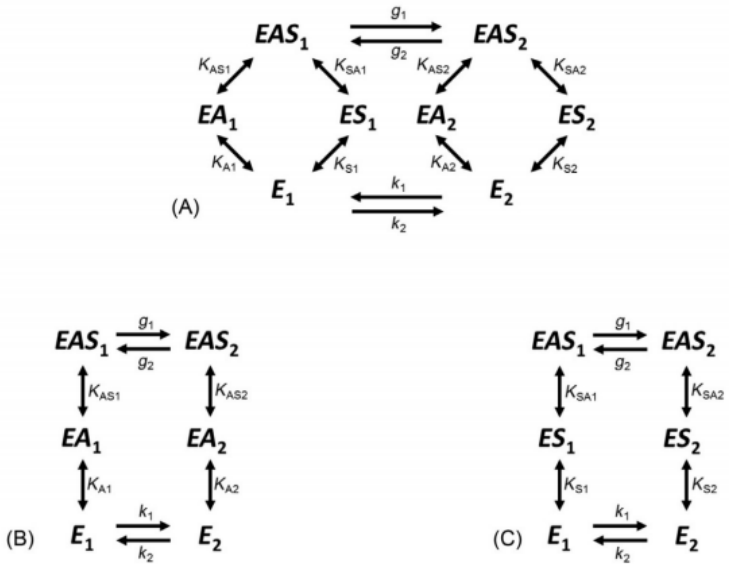
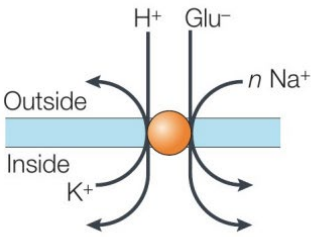


Рисунок 8.19. Варианты кинетических схем котранспорта (по Крейну)

Пример использования стехиометрии для создания больших градиентов используется в Glu -эргических синапсах. Они составляют 80% синапсов в мозге. При их работе, в синаптическую щель выбрасываются везикулы с медиатором, который диффундирует в пределах синаптической щели, где связывается со своим рецептором. В ходе обратного захвата медиатора из щели требуется создавать равновесную концентрацию в щели, намного меньшую константы его связывания т.к. его рецепторы обладают огромной аффинностью. По этой причине, на мембране астроцитов и пресинаптической мембране находятся Glu – обменники, обладающие высокой эффективностью. Эти переносчики

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

одновременно переносят Glu, H+, Ka+ и несколько ионов Na+, таким образом, что все ионы кроме глутамата проходят по своему градиенту концентрации (рис. 8.20).



$$[Glu]_o = [Glu]_i\,([Na^+]_i/[Na^+]_o)^n\,([H^+]_i/[H^+]_o)\,([K^+]_o/[K^+]_i)\,e^{(n-1)VF/RT}$$

n	$[Glu]_o$	% of NMDA p_{max} (steady state)
1	21 µM	99%
2	0.18 µM	13%
3	0.0016 µM	0.002%

Рисунок 8.20. Слева - схема работы обменника. Справа - концентрация глутамата в щели и процент активированных NMDA-рецепторов, в зависимости от количества переносимых ионов Na+

Пример симпортера с известной молекулярной структурой: LacY (рис. 8.21)

1. переносит галактозу вместе с H+ в E. coli
2. принадлежит надсемейству MFS (как и GLUT)
3. 12 ТМ доменов

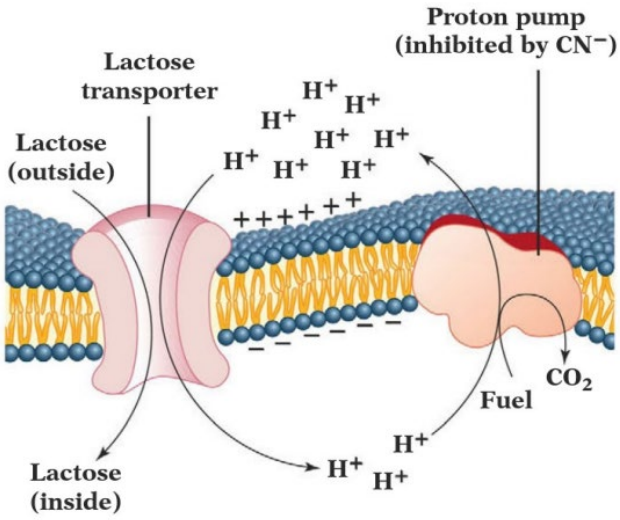


Рисунок 8.21. Схема работы LacY

Общая схема транспорта сахара из просвета кишечника в кровь:

1. Вторично активные переносчики захватывают сахар из просвета кишечника в клетку
2. Из клетки сахар поступает в кровь путем облегченной диффузии
3. Na^+ градиент восстанавливается за счет Na^+/K АТР-азы

Насосы: первичный активный транспорт

Для использования градиентов Na^+ и других ионов, в системах симпорта и антипорта, эти градиенты нужно создать “насосами”, т.е. первичным активным транспортом, за счет энергии АТФ.

Na/K-АТФаза:

· блокируется уабаином

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

· гидролиз АТФ происходит в 2 этапа
· представитель АТФ-аз P-типа

Открытие этого насоса произошло при изучении донорской крови. Было замечено, что в выдержанной донорской крови все мембранные градиенты на эритроцитах перейдут в равновесное состояние. Но, если к такой крови добавить глюкозу, то произойдет восстановление нормальных градиентов. При дальнейшем изучении стало понятно, что для нормальной работы насоса необходимо, чтобы внутри клетки находился АТФ, а снаружи – K^+. Кроме того, для дефосфорилирования фосфорилированного переносчика, связавшего Na^+, необходимо добавить K^+ снаружи. Помимо этого, дефосфорилирование блокируется веществом NEM, при этом K^+ перестает влиять на процесс (рис. 8.22). Особенность этого вещества еще и в том, что при добавлении к заблокированному белку раствора ADP, происходит ресинтез ATP с высвобождением Na^+.

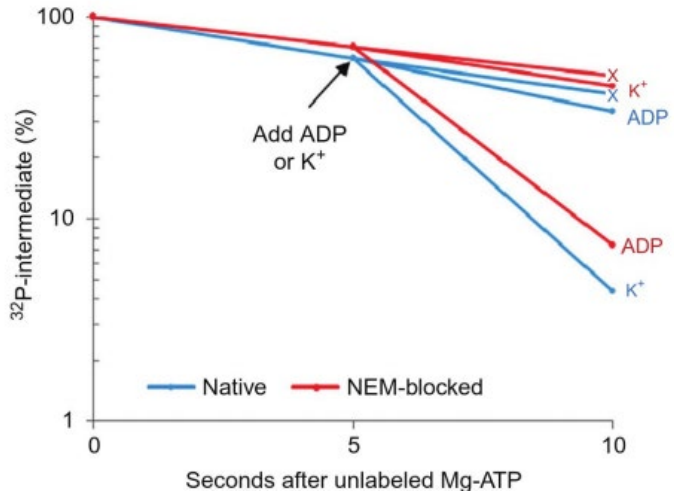


Рисунок 8.22. Изменение концентрации интермедиатов при работе Na/K-атфазы в нативном и заблокированном состояниях

Эти наблюдения дали понять, что белок имеет две конформации (рис 8.23):

1. Способную связывать Na^+, обращенную внутрь клетки
2. Способную связывать K^+, обращенную наружу клетки

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

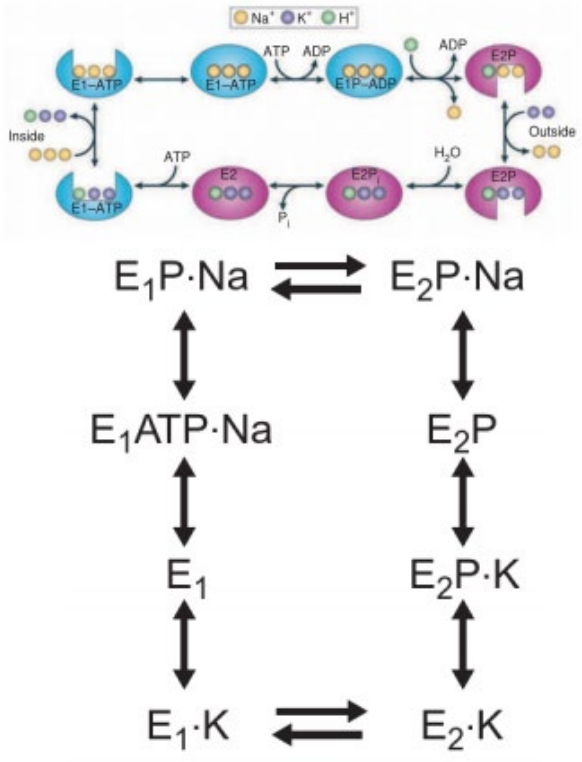


Рисунок 8.23. Классическая кинетическая схема цикла Na/K-насоса Альберса-Поста

Описание цикла Na/K-насоса:

1. В конформации E_1 сайт связывания находится внутри клетки
2. Белок связывает АТФ и натрий
3. Остаток фосфата переносится на белок, АДФ удаляется
4. Белок меняет конформацию и экспонирует сайты связывания наружу
5. Натрий диссоциирует
6. Происходит связывание калия
7. Остаток фосфата отсоединяется
8. Белок меняет конформацию и экспонирует сайты связывания внутрь

Сайт связывания ионов общий, но в зависимости от конформации меняется его сродства к каждому иону.

Ca^{2+} -АТФаза (SERCa) – мембранный белок ЭПР, гомологичный Na/K-насосу.

Если проследить изменение концентраций молекула процессе работы насоса, то можно увидеть классическую для кинетики Михаэлиса-Ментен картину (рис. 8.24).

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

Можно заметить, что скорость увеличения концентрации в два раза выше скорости

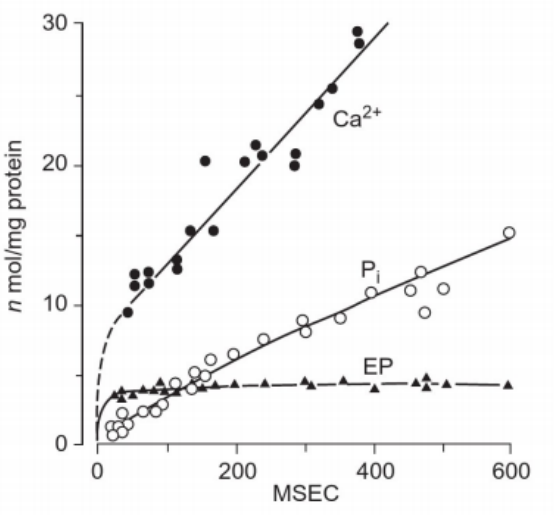


Рисунок 8.24. График изменения концентраций веществ во времени, при работе Са-насоса

увеличения концентрации фосфата, что позволяет сделать вывод о переносе насосом двух ионов Ca^{2+} за один цикл (рис. 8.25).

Японские исследователи воспроизвели больше количество структур Са-АТФазы,

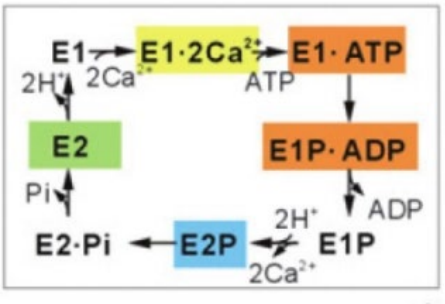


Рисунок 8.25. Упрощенная кинетическая схема работы Са-насоса

блокируя ее на разных стадиях активного цикла. Благодаря этому, они смогли восстановить всю ее кинетическую схему (рис. 8.26).

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

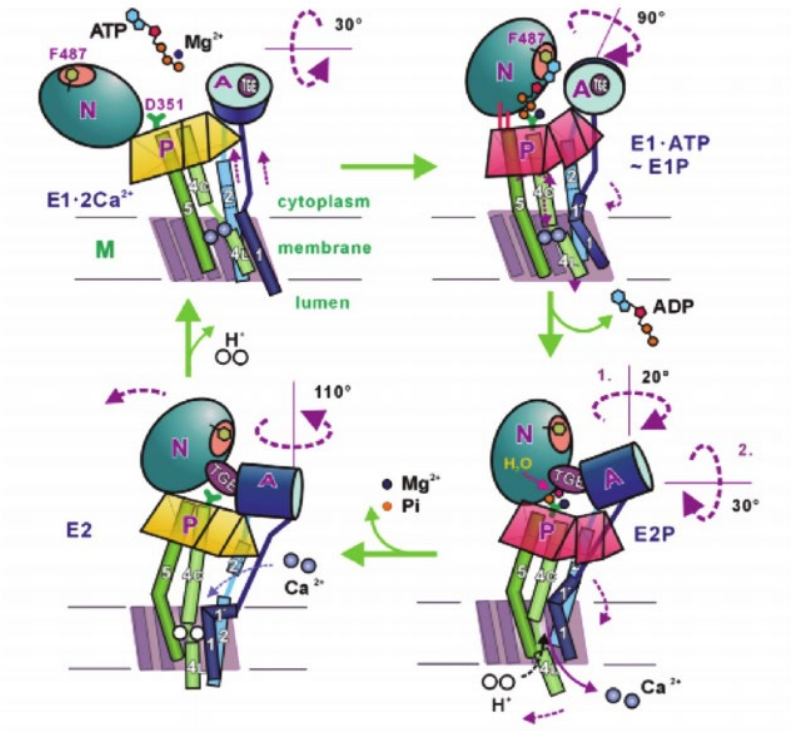


Рисунок 8.26. Конформационные превращения Ca-насоса

Белок содержит домен, связывающий нуклеотиды (N), домен, названный актуатором (A), передающий конформационные изменения, и домен, который связывает фосфат (P). Связывание Ca^{2+} сопровождается масштабными поворотами, при этом изменяется электронная волновая функция молекулы, которая соответствует новому энергетическому минимуму. Сайты связывания Ca^{2+} в момент связывания организованы таким образом, что первый сайт связывания готов к связыванию, а второй находится в конфигурации, которая не соответствует гидратной оболочке иона. Но связывание первого иона меняет второй сайт, делая его более выгодным для связывания Ca^{2+}.

Ионные каналы

Описанные выше реакции были можно было рассматривать как ферментативные. Ионные каналы работают по-другому – они фактически образуют внутри себя пору, через которую проходят иону. И если белки переносчики способны совершать 100-1000 актов работы в секунду, то ионные каналы образуют гораздо большие потоки вещества.

Ионные каналы можно исследовать методом patch-clamp (рис. 8.27), когда участок мембраны помещается на кончик пипетки с тонким стеклянным кончиком, покрытым специальным силиконовым составом, путем создания в пипетке отрицательного давления. Этот метод доступен в различных конфигурациях.
Если посмотреть на ток через пипетку, содержащую ионный канал в конфигурации inside-out, то он будет возникать и пропадать, что свидетельствует о двух конформациях канала (рис. 8.28). Причем, при разных значениях разности потенциала на мембрани, доля времени нахождения в каждой из конформация будет различна. Это верно для

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

потенциалзависимых каналов. Для лиганд-активируемых каналов доля времени будет зависеть от концентрации лиганда.

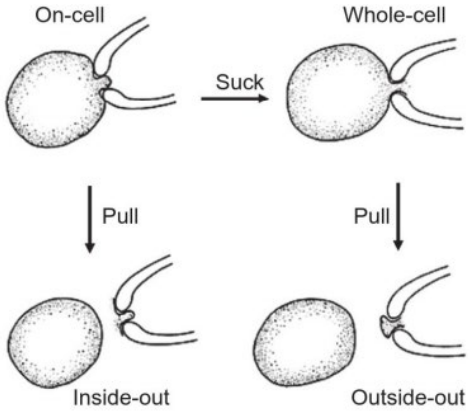


Рисунок 8.27. Конфигурации метода patch-clamp

Рисунок 8.28. Ток через одиночный канал

Важно понимать, что каждый отдельный канал постоянно совершает конформационные переходы между проводящим и непроводящим состояниями (рис.8.29).
Существует несколько различных семейств каналов. Большинство потенциалзависимых каналов гомологичны потенциалзависимым Са-каналам. Еще выделяют два семейства лигандзависимых каналов: P2X (рецепторы глутамата) и Cys-loop (содержащие «цистеиновую петлю»).
Потециалзависимые К-каналы (рис. 8.30).
Особенности строения:

- S5, S6, P – консервативные домены, базовые для всех каналов
- S4 – несет заряженные аминокислоты, определяющие потенциалчувствительность

Образуют канал путем тетромеризации. Субъединицы образую воронку из доменов S6, при этом последовательности, выполняющие функции фильтра, обращены наружу (рис. 8.31).

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

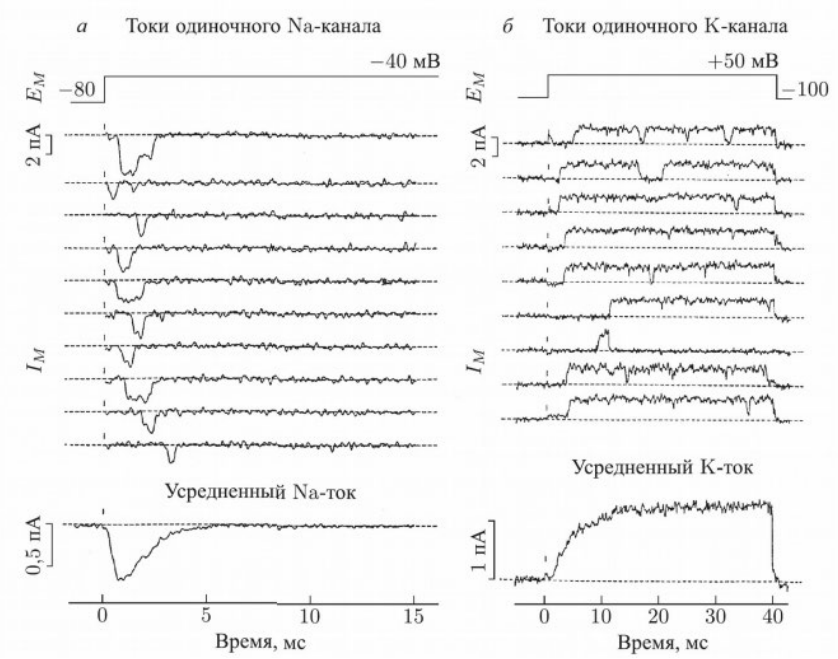


Рисунок 8.29. Токи одиночных каналов и интегральный ионный ток.

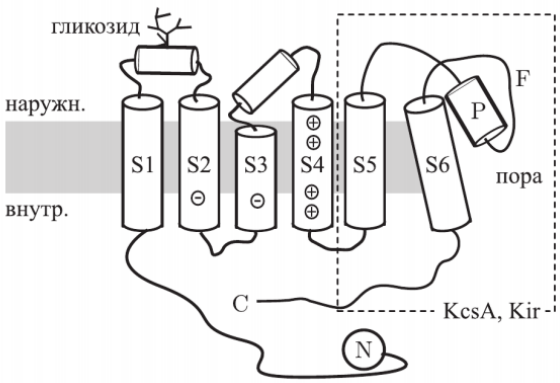


Рисунок 8.30. Схема структуры α-субъединицы K-каналов

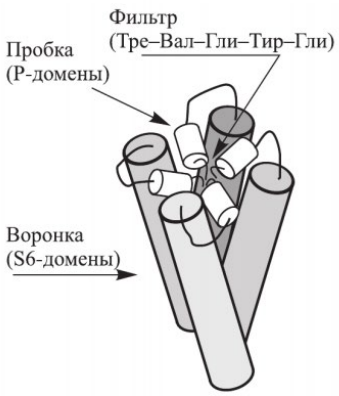


Рисунок 8.31. Схема организации поры доменами S6 и P при тетрпамеризации

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

Набор доменов может различаться у разных доменов. Так, зачастую, могут меняться и исчезать, S_{1-3} домены, влияющие на модуляцию канала или N-конец нести блокирующую последовательность.

В центре канала находится полость, заполненная молекулами воды (рис 8.32), внизу которой находится воротный механизм. Кроме того, Р-домен имеет суммарный диполь и стабилизирует ионы K^+ внутри канала.

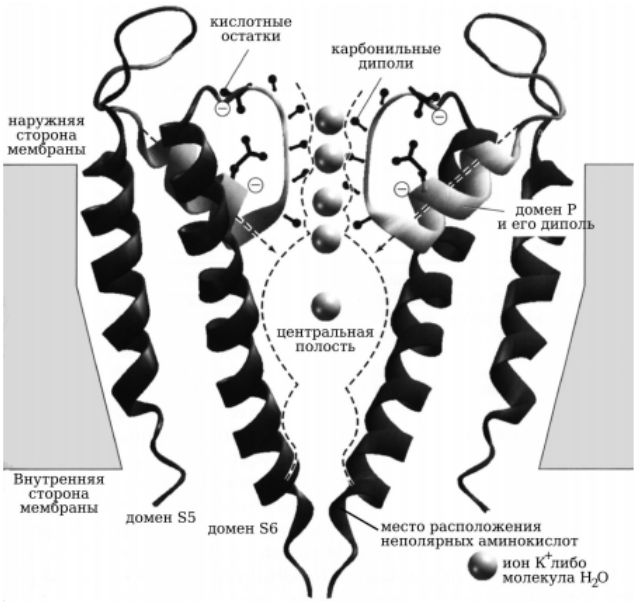


Рисунок 8.32. Схема канала и описание стабилизации ионов в нем

В воротном механизме, в закрытом состоянии, находятся гидрофобные ароматические аминокислоты. В момент открытия канала, одновременно с небольшим увеличением диаметра ворот, отодвигаются ароматические аминокислоты, закрывающие ток ионов (рис. 8.33).

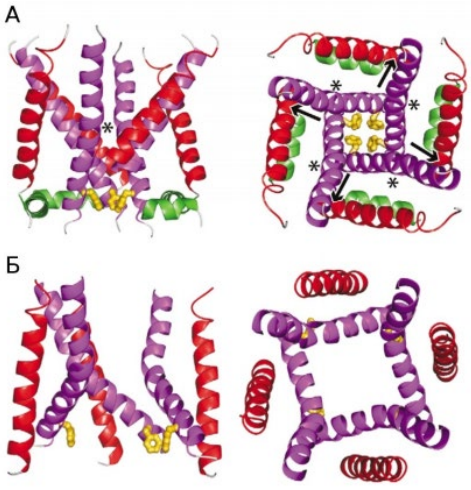


Рисунок 8.33. Воротный механизм ионного канала

Рецепторы с цистеиновой петлей (Cys-loop) образуются путем пентомеризации. Представители семейства:

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

- nAChR
- 5-HT3R
- GABAA/CR
- GlyR
- Zn2+-activated cationic ch.
- Бесп: анионные 5-HTR и GluR
- Бесп: катионные GABAR

Особенности:

- Гетеропентамеры:
  - αβγδε...
  - 2:2:1 α:β:γ (GABAR)
  - α2 βεδ (nAChR)
- Консервативная петля из дисульф. связи, соединяющая цистеины, фланкирующие короткую консервативную последовательность из 13 амк между канальной и рецепторной частями белка

Связывание белка происходит на интерфейсе между субъединицами (рис. 8.34).

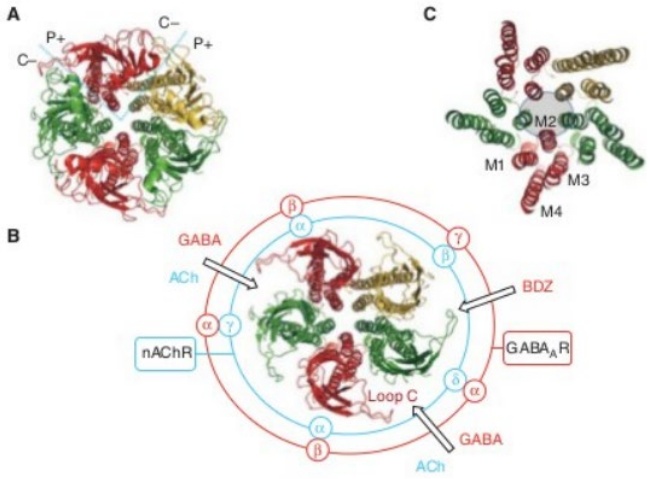


Рисунок 8.34. Изображение Cys-loop рецептора

Связывание ацетилхолина происходит на сайте, в который смотрит несколько ароматических аминокислот. При связывании, петля С (рис.8.35) захлопывается над лигандом как крышка и приводит к механическому натяжению одного из β-слоев. Это натяжение вызывает перемещение доменов аминокислот, связанных солевым мостиком, рядом с цис-петлей. После этого трансмембранные домены изменяют конформацию и канал открывается

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

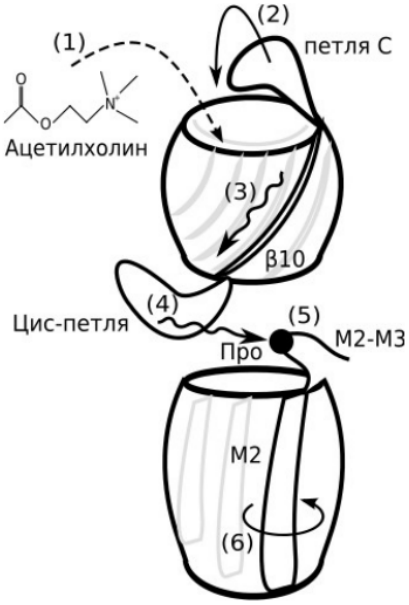


Рисунок 8.35. Процесс связывания ацетилхолина рецептором.

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

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

Лекция 5

Изменение энтропии в открытых системах

Изменение термодинамических переменных во времени:

1. Соотношение между термодинамическими переменными во времени не изменяется
2. Все переменные зависят от времени, т.к. изменяются концентрации

Разделим энтропию на две части для системы, стремящейся перейти в стационарное состояние, и посмотрим на изменение энтропии. На изменение энтропии за счет обмена со средой не всегда влияют только лишь свойства самой системы, на нее влияет множество условий, поэтому работать с ней очень трудно.

Существует постулат: все изменение энтропии рассматриваемой открытой системы будет определяться только внутренними необратимыми процессами. Это кажется странным, т.к. в систему идет поступление питательных веществ, но предполагается, что все эти процессы проходят равновесно. Таким образом:

- Внутренние процессы идут неравновесно, с конечными скоростями
- Внешние процессы идут равновесно с бесконечно малыми скоростями

В таком случае, изменение энтропии связанное с обменом с внешней средой можно представить:

$$d_{\mathrm{e}}S = \frac{dQ}{dT} \qquad (9.1)$$

Такая система называется открытой системой в частично равномерном состоянии.

Данное предположение работает в приближении, что данные процессы протекают независимо друг от друга. Приближение, эквивалентное этому, уже использовалось в кинетике при рассмотрении разделения быстрой и медленной переменных.

Это позволяет заняться только энтропией внутренних процессов $d_{\mathrm{e}}S$:

$$\beta = T\frac{d_i S}{dt} = AV > 0 \quad (9.2)$$

где A – величина химического сродства, V – скорость биохимической реакции

Величина химического сродства будет равна сумме произведений химических потенциалов веществ на соответствующие стехиометрические коэффициенты. Тогда реагенты будут стоять в этом уравнении со знаком «-», продукты – со знаком «+».

$$A = -\Sigma\mu_i\nu_i \quad (9.3)$$

AV всегда положительна, либо равна 0 в случаях, когда никаких процессов не происходит. Это верно для системы и вовсе не обозначает, что каждое из произведений больше нуля, например, в случае сопряжения.

Рассмотрим реакцию свободного окисления глюкозы с запасанием энергии в виде АТФ (рис. 9.1)

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

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

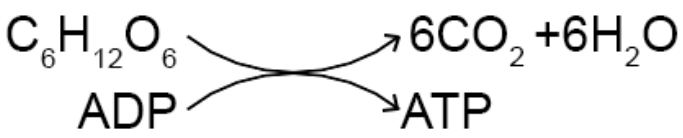


Рисунок 9.1. Реакция окисления глюкозы, сопряженная с синтезом АТФ

Пусть сопряженный процесс, процесс фосфорилирования АДФ, будет обозначаться как A_1V_1, тогда $A_1V_1 < 0$, т.к. энергия запасается. Сопрягаемый процесс, окисление глюкозы, будет $A_2V_2 > 0$, т.к. является источником энергии для сопряженной реакции. Важно, что сумма $A_1V_1 + A_2V_2 > 0$. Из этих данных можно получить КПД реакции, она ровна отношению скорости запасания энергии, к скорости ее продуцирования.
Из этих данных можно произвести расчет предельной скорости запасания энергии:
$|V_1| \leq \frac{A_2V_2}{A_1}$ (9.4)
Скорости отражают изменение концентраций веществ и не зависят от механизмов.
Подход, примененный в равенстве 9.3, можно применить и в других процессах (9.4).
Например, поток тепла, равный $\frac{dQ}{dt}$, и градиент температур. Электрический ток:
разность потенциалов, как движущая сила, и поток – поток электронов, или поток электронов и сила электрохимического потенциала.
$\beta = \sum Jx$ (9.4)
Рассмотрим подробнее каждый из множителей равенства 9.3:

X = A = $-\Sigma\mu_i\nu_i$

J = $\dot{C}_\iota$ = $V_1 - V_2$

$\dot{C}_\iota$ будет равна нулю в стационарном состоянии,

$V_1 - V_2$ – скорость притока минус скорость оттока

Равенство потока нулю может происходить по двум причинам:

1. В случае равенства притока и оттока
2. В случае равновесия, когда нет ни притока, ни оттока, т.к. на каждом из этапов процесс равен обратной реакции

Соотношение Онзагера

Разложим поток в ряд Тейлора в близи точки равновесия:
$J(x) = J(x_{eq}) + J'_{eq}(x)\Delta x$ (50)
где x_{eq} – точка равновесия, Δx – величина отклонения
Поток в точке равновесия равна нулю:
$J(x_{eq}) = 0$
$\Delta x = x - x_{eq} = x$
$J'_{eq}(x) = L$
Подставляем полученные равенства в 50:

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

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

$J(x) = Lx$ (9.5)

Данное уравнение называется линейным соотношением Онзагера. Таким образом, в первом приближении мы получаем, что скорость потока линейно зависит от движущей силы. Это верно не только вблизи равновесия, но и вдали от него.

Теперь рассмотрим два процесса в близи равновесия, где работают линейные соотношения Онзагера. Пусть эти процессы сопряжены. Мы не знаем, как эти процессы связаны с точки зрения молекулярного механизма. Рассмотрим линейные соотношения Онзагера, учитывая, что эти потоки зависят и от своей движущей силы, и от движущей силы другого потока.

$$\begin{cases} J_1 = L_{11}x_1 + L_{12}x_2 \\ J_2 = L_{21}x_1 + L_{22}x_2 \end{cases} \quad (9.6)$$

$L_{12} = L_{21}$

Из этих уравнений можно рассчитать коэффициент сопряжения:

$$q = \frac{L_{12}}{\sqrt{L_{11}L_{22}}} \quad (9.7)$$

Рассмотрим, как работаю наши приближения в удалении от равновесия. Возьмем закон Ома: сила тока прямо пропорциональна напряжению, помноженному на коэф. L (равный $\frac{1}{R}$). Запишем его в классическом виде:

$U = IR$

Этот закон выполняется в широком диапазоне.

Рассмотрим активный транспорт Na^+ (рис. 9.2). Na может двигаться по градиенту концентрации, но его движение, как заряженного иона, подчиняется разности электрического потенциала. Значит, эти потоки связаны. Подставим наши значения:

$$\begin{cases} I_1 = L_{Na}x_{Na} + L_{Na,r}x_r \\ I_2 = L_{Na,r}x_{Na} + L_r x_r \end{cases} \quad (9.8)$$

Движущая сила пассивного проникновения Na^+ — это электрохимический потенциал:

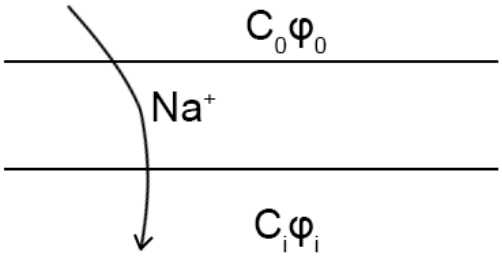


Рисунок 9.2. Схема рассматриваемого переноса Na

$$x_{Na} = \Delta\mu = RTln\frac{C_i}{C_0} + zF\Delta\varphi \quad (9.9)$$

Кроме того, в активном транспорте ионы Na могут переноситься за счет молекулы ATP. Таким образом, поток зависит еще и от движущей силы активного транспорта.

$x_{Na} = A_{ATP \rightarrow ADP}$

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

Скорость потока натрия будет равна скорости его переноса, а скорость запасания энергии в виде АТФ, которая тратится на активный транспорт, равна скорости поглощения кислорода:

$I_{Na} = V_{Na}$

$I_r = V_{O_2}\downarrow$

Учтем, что коэф. взаимного влияния вблизи равновесия равны.

В эксперименте, для определения коэффициентов L мы можем уравнять концентрации натрия внутри и снаружи. Тогда мы можем убрать электрохимический потенциал. В таком случае, потоки Na и скорость поглощения кислорода будут зависеть только от $\Delta\varphi$. При таких условиях измерение даст линейную зависимость в широком диапазоне значений электрических потенциалов.

Можно поступить иначе – дать разобщитель, напр. валиномицин, который «пробивает» электрическую составляющую. Тогда мы можем смотреть зависимость скоростей от концентрации снаружи, которую можно менять. Отсюда мы можем определить наклон - т.е. узнать значения коэффициентов.

Рассмотрим работу АТФ-синтазы. Проведем аналогию с турбиной, находящейся в потоке воды (в нашем случае – электронов), где турбина – АТФ-синтаза (рис. 9.3). В стационарном состоянии вся энергия будет уходить на поддержание скорости синтеза АТФ. Добавив, к примеру, в систему разобщитель, мы можем «срезать лопасти турбине».

Рассмотрим пример с набуханием клеток. Погрузим клетку в раствор с повышенным содержанием какого-то вещества.

Рассмотрим три случая:

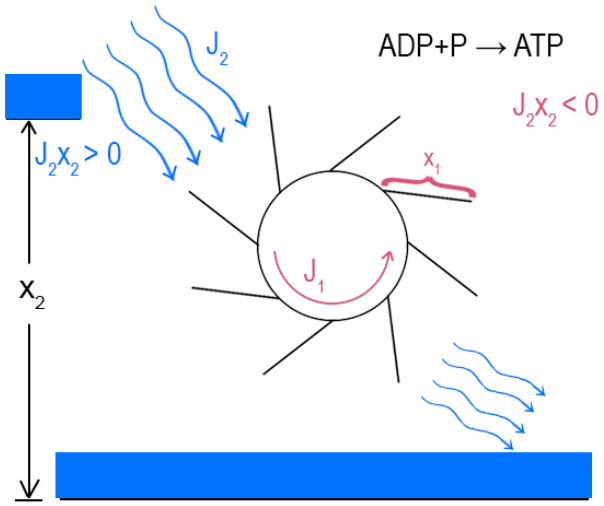


Рисунок 9.3. Аналогия с турбиной для описания потоков, участвующих в синтезе АТФ

1. Если мембрана полностью для него проницаема, то выход воды будет полностью компенсироваться потоком этого вещества внутрь. Размер клетки тогда начнет уменьшаться, а потом выровняется к первоначальному состоянию. σ = 0

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

2. В случае, если мембрана совершенно непроницаема для вещества, то вода будет выходить, размер клетки быстро уменьшится и останется небольшим. σ = 1
3. При частичной проницаемости мембраны, клетка будет постепенно возвращаться к первоначальному объему. 0 < σ < 1

σ - коэффициент избирательности. Он равен:

$$\sigma = \frac{-L_{PD}}{L_{PP}}$$

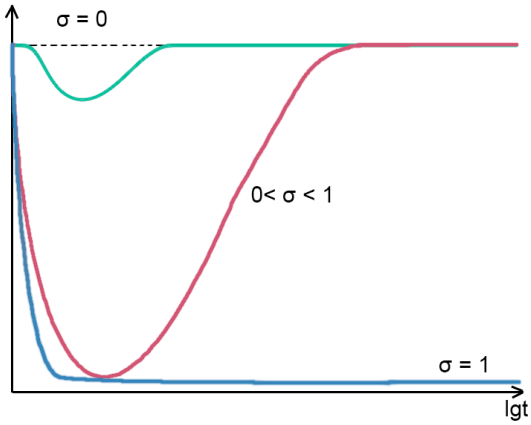


Рисунок 9.4. График изменения размера клетки во времени при разных значениях мембранной избирательности

Пример макромолекулярных комплексов, механизмы трансформации энергии которых уже изучены:

1. Фотосинтетические реакционные центры
2. Митохондриальные АТФ-синтазы
3. Фотохимический цикл бактериородопсина, где за счет энергии света создается градиент протонов, идущий на синтез АТФ.

Сопоставление скорости изменения энтропии с приближением системы к стационарному состоянию

Попробуем определить, есть ли возможность с помощью каких-либо термодинамических закономерностей оценить, идет ли система к стационарному состоянию, или нет.

Допустим, в системе идут два процесса, один из которых перешел в стационарное состояние. Воспользуемся соотношением Онзагера:

$$\beta = J_1 x_1 + J_2 x_2 > 0$$

$$\beta = L_{11} x_1^2 + 2L_{12} x_1 x_2 + L_{22} x_2^2 > 0 \quad (9.10)$$

Для того, чтобы выяснить, как меняется β в зависимости от x, продифференцируем функцию по dx:

$$\frac{d\beta}{dx_1} = 2(L_{11} x_1 + L_{12} x_2) = 2J_1 = 0 \quad (9.11)$$

Это значит, что величина продуцируемой энтропии внутри открытой системы, за счет внутренних необратимых процессов, есть всегда положительная величина, и в стационарном состоянии эта величина принимает минимальное, но положительное значение (рис. 9.5).

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

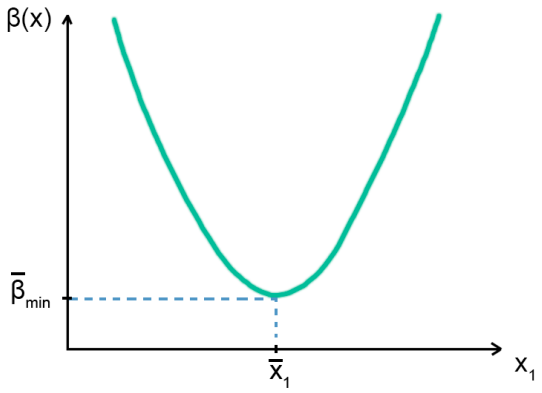


Рисунок 9.5. График изменения продуцируемой энтропии

Если мы отклоним систему от равновесия, то величина x_1 изменится. В этом случае произведение отклонение от стационарного состояния на отклонение потока будет положительной величиной, если исходное состояние было устойчиво.

Пригожин выдвинул термодинамическую теорию развития и эволюции организмов. Если можно сопоставить эволюционные процессы и рост организма с теплопродукцией, то эта теплопродукция должна быть минимальной и постоянной.

При рассмотрении экспериментальных данных эмбрионального развития икры, можно увидеть, что теплопродукция будет постепенно уменьшаться и после переходить в стационарное состояние. Похожая картина получается при заживлении ран (рис. 9.6).

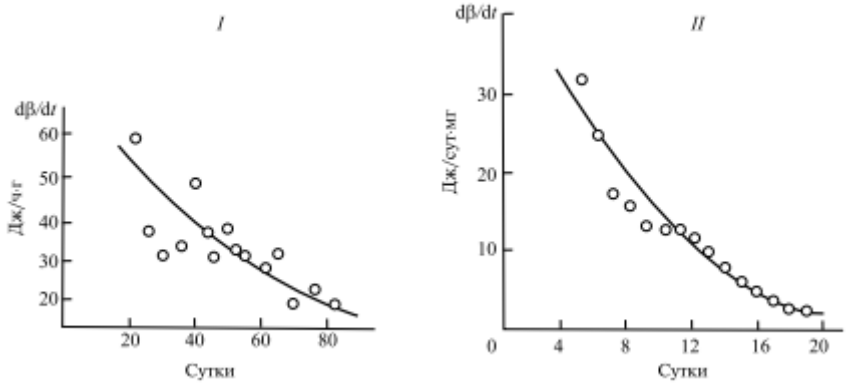


Рисунок 9.6. Скорость теплопродукции икры форели (1) и яиц кур (2)

Однако, данный подход подвергается критике по нескольким причинам:

1. В эволюционном положении, если учитывать температуру теплокровных животных, то по отношению к холоднокровным зависимость нарушается.
2. Если исходно сопоставлять тепловой эффект реакции со скоростью изменения энтропии в необратимых процессах, то энтропия самих реагентов, участвующих в химических реакциях, не изменяется, что противоречит истине. Так, например, при эмбриогенезе теплопродукция, берущаяся в ходе свободного окисления, идет на разные процессы, на разных этапах развития.

Этот подход подходит, в основном, для процессов, где мы знаем, как протекает реакция.

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

Посмотрим, может ли в стационарном состоянии скорость продуцирования энтропии минимальна и постоянна при автоколебательном процессе. Сконструировать такую функцию очень сложно. Отсюда следует вывод, что колебательные процессы невозможны вблизи равновесия.

Сопоставим термодинамические критерии поведения системы вблизи стационарного состояния с кинетическими, которыми мы занимались. Возьмем систему и будем отклоняться от состояния равновесия. В равновесии движущие силы равны нулю. При небольших отклонениях мы все еще будем находиться в области линейной термодинамики, постепенно переходя в нелинейную.

В области линейной термодинамики будут работать теорема Пригожина и термодинамический признак устойчивости. При нарушении признака устойчивости, когда произведение будет меньше нуля, появляются термодинамически неустойчивые состоянии (рис. 9.7).

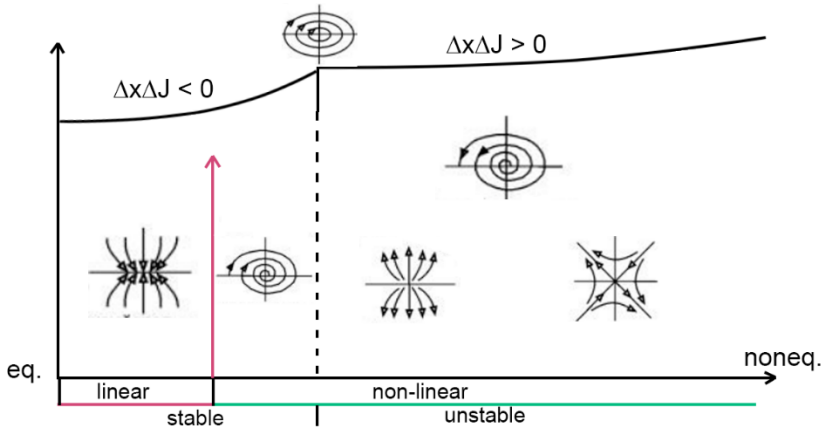


Рисунок 9.7. Диаграмма, отражающая изменения при удалении от точки равновесия

Сопоставим это с поведением системы в кинетическом смысле:

1. В области линейной термодинамики, когда состояния устойчивы, при переходе от «устойчивого узла» к «устойчивому фокусу», термодинамические условия Онзагера нарушаются. Исследования показывают, что линейность остается, но нарушаются соотношения взаимности.
2. На грани устойчивости находится точка типа «центр»
3. При переходе границы устойчивости появляются термодинамические флуктуации.

Применение теории информации в биологии

Многие биологические молекулы, напр. ДНК или белки, участвующие в молекулярном докинге, в той или иной степени являются носителем информации. В таком случае, можно сопоставить изменение энтропии, как степени беспорядочности, с процессом создания информации. Как известно, энтропия равна:

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

$S = klnW$ (9.12),

где k – константа Больцмана, W – число микросостояний,
реализующих данное макросостояние системы

За единицу информации принимается количество информации, которое равно логарифму при основании 2 от количества возможных вариантов.

Возьмем аудиторию, в которой находится 64 студента. Допусти, один студент ушел с лекции, тогда декан получит информацию о прогульщике, равную:

$I = log_2 64 = 6\ bit$ (9.13)

Если у нас есть система, которая может перемешиваться, то уменьшение ее энтропии при этом приводит к рождению информации.

$S = 2{,}3 \cdot 10^{-24} I$ (9.14)

Взяв некоторое количество воды и заморозив ее, мы получим кристаллическую решетку льда, с известным расположением молекул. Тогда мы при уменьшении энтропии получим информацию о координатах молекул. Количество этой информации и будет соответствовать энтропии кристаллизации воды.

Оценка информации, которая содержится в организме человека тоже возможна. Представим клетки человека, разложенными на столе, при этом, составить организм человека можно одним лишь способом. Воспользуемся формулой 57 учитывая, что в организме человека примерно 10^{13} клеток. Тогда число вариаций перестановок этих клеток - $10^{13}!$. Информация, которую нужна для верной расстановки клеток равна:

$I = log_2(10^{13}!) \approx 4 \cdot 10^{14}$ бит

Прием по внимание состав клеток, тогда количество информации увеличится еще на 12 порядков:

$I \approx 10^{26}$

Рассмотрим количество энтропии, эквивалентное этому количеству информации:

$S = 2{,}3 \cdot 10^{-24} \cdot\ 10^{26} = 200$ энтропийных единиц

Это соответствует примерно килограмму глюкозы. На самом деле, есть нюанс в том, что система не может запомнить каждое состояние. Для хранения мы можем, например, заморозить нашу систему. Эту ситуацию можно сравнить с гипотетическим бильярдным столом с плоскими лунками, где каждый шар, хоть и может находиться в своей лунке, но не может там сохраниться. В случае нормального стола состояние шара сохраняется только когда шар падает в лунку, т.е. когда совершается некоторая работа. Тогда полученное макросостояние система может запомнить.

Для использования информации необходимы следующие этапы:

1. генерация информации
2. запасание
3. обработка
4. передача
5. восприятие

Только все эти этапы определяют истинную ценность информации в сопоставлении с энергетикой.

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

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

Важность восприятия информации можно сравнить со чтением одного письма разными людьми. Это письмо, имея один набор букв, т.е. неся одну и ту же информацию, может быть в разной степени информативна для разных людей.

Существует два способа запасания информации в молекулах-носителях:

1. Принцип запоминания случайного выбора, как в случае ДНК,
2. Неслучайный отбор

Рассмотрим этапы использования информации на примере ДНК. Получение информации представляет собой считывание в процессе ее биосинтеза.

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

Лекция 6

Работа биологической системы на молекулярном уровне

Все представления из прошлых лекций работают на этапе взаимодействия макромолекул. Физхимия работает «до места подачи сырья и выброса продукта», но дает мало представления о процессе «в месте их переработки».

Простой пример, показывающий, что при переходе к реальности, как организованы биологические системы на молекулярном уровне и сравнить базовые принципы организации с принципами на которых основана кинетика Аррениуса и термодинамика, то увидим следующее:

Возьмем пример цепи переноса электрона (рис. 10.1).

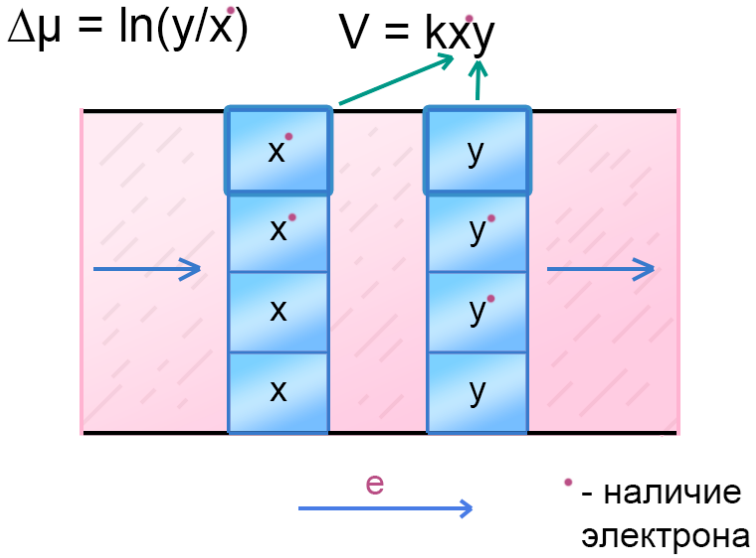


Рисунок 10.1. Возможные варианты ситуаций при передаче электрона в цепи

Возможны четыре ситуации расположения электрона в доноре и акцепторе.

1. Восстановленный донор, окисленный акцептор
2. Восстановленные донор и акцептор
3. Восстановленный акцептор и окисленный донор
4. Окисленные донор и акцептор

Для оценки скорости возьмем концентрации восстановленных доноров и окисленных акцепторов и k – константу скорости, отражающую число событий в единицу времени. Однако, данный подход не работает, т.к. пары донор-акцептор представляют из себя полноценные устройства. Так, в расчете скорости мы используем концентрацию всех восстановленных доноров, но в ситуации, когда в этой паре восстановлены оба участника – процесса передачи не произойдет. Это применимо по аналогии и к концентрации окисленного акцептора. Поэтому сделаем вывод о том, что формулы скорости и потенциала из примера выше работают только в случае независимых столкновений реагентов.

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

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

Выполним следующий шаг. Возьмем белок и рассмотрим белок с точки зрения базовых принципов его организации, поймем, какие основные силы и взаимодействия формируют его стабильную структуру, как понижается свободная энергия. Энтропию пока не будем учитывать, т.к. ее сложно учесть в пределах одной молекулы.

Основной принцип работы – не столкновение макромолекул (т.к. они находятся в конденсированном состоянии), а взаимодействие отдельных частей этой молекулы между собой. Это послужило созданию концепции «белок-машина».

Белок имеет уникальные свойства:

1. Плотность нативного белка примерно равна плотности в кристаллическом состоянии
2. Многие белки после денатурации и последующей ренатурации способны к самосборке.

Гидрофобные взаимодействия

Вода имеет ячеистую структуру, из-за наличия водородных связей (рис. 10.2), при этом энтропия понижается. Это термодинамически невыгодно, но энергия водородных связей больше по абсолютной величине, чем произведение TΔS в формуле 59 и поэтому данная система термодинамически стабильна.

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S \qquad (10.1)$$

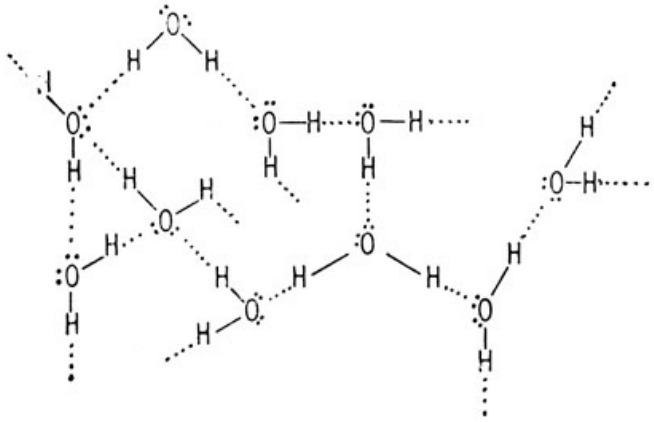


Рисунок 10.2. Водородные связи между молекулами воды

События, после попадания гидрофобной частицы в воду:

1. Когда углеводород попадает в воду, разрываются водородные связи между молекулами. При этом, сам углеводород не может создать связей с водой, поэтому происходит ее уплотнение, нарушение ячеистой структуры, что приводит к падению ΔS. И чем больше будет размер частицы – тем более будет заметно понижение энтропии.
2. Для понижения поверхности гидрофобных частиц, они стремятся образовать общую фазу
3. Далее происходит расслоение на фазы

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

При увеличении температуры гидрофобный эффект будет расти, при понижении – гидрофобные взаимодействия будут уменьшаться (рис. 10.3). Гидрофобность можно оценить по формуле 60:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (10.2)$$

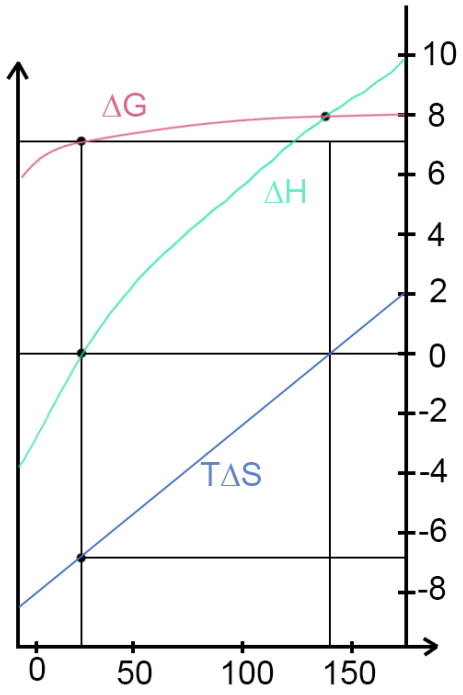


Рисунок 10.3. Зависимости термодинамических переменных от температуры

Исходя из этой формулы можно сделать вывод о том, что денатурацию белка можно произвести и при помощи понижения температуры, когда энергия гидрофобных связей будет уменьшаться. Это явление открыл российский биофизик Привалов.

Теплоемкость – количество тепла, которое необходимо дать системе, чтобы поднять ее температуру на один градус.

Теплоемкость обычно увеличивается с увеличением температуры.

При изучении теплоемкости белков, навеску поместили в калориметр. Скорость нагрева есть скорость изменения температуры:

$$U_T = \frac{dT}{dt} \qquad (10.3)$$

Теплоемкость представляет собой производную от тепла по температуре:

$$C_p = \frac{dQ}{dT} \qquad (10.4)$$

Теплоемкость белка достаточно велика по сравнению с низкомолекулярными соединениями того же молекулярного веса, но не свернутыми в глобулу. При нагреве белка, его теплоемкость будет постепенно повышаться, достигая пика, и после постепенно снижаться (рис. 10.4). Это происходит потому, в каждой точке имеется равновесие между нативной и денатурированной формой. У денатурированного белка теплоемкость меньше, чем у свернутого, т.к. нативная форма начинает «плавиться» и

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

только потом она расплетается. В тот момент, когда она только начинает расплетаться, у нее обнажаются внутренние гидрофобные поверхности и начинают проявляться гидрофобные взаимодействия, которые надо убрать. И потом, когда наступает равновесие между нативной и денатурированной формами, наступает пик. Дальше теплоемкость уменьшается, т.к. начинает преобладать расплавленная форма, имеющая меньшую теплоемкость. Когда белок полностью переходит в денатурированную форму можно увидеть, что его теплоемкость все равно выше изначальной, т.к. теплоемкость, как мы помним, зависит от температуры.

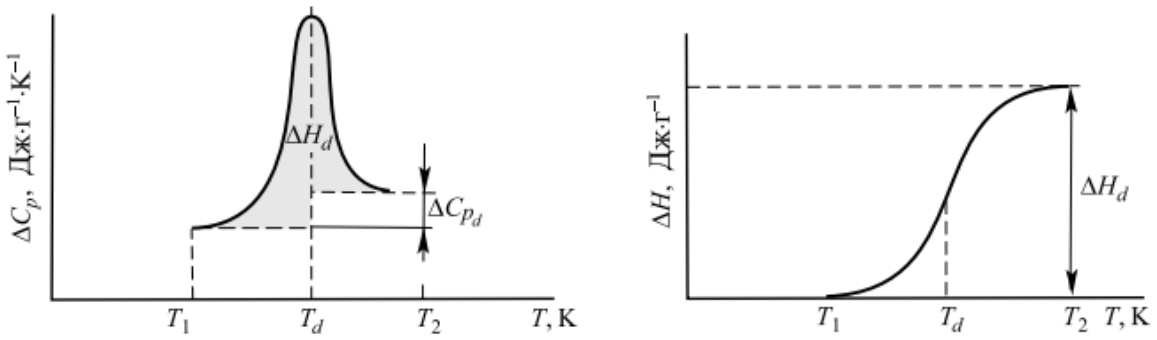


Рисунок 10.4. Изменение теплоемкости ΔC_p и энтальпии ΔH в области тепловой денатурации биополимеров

Из этого опыт возникло представление о плавлении белка (рис. 10.5).

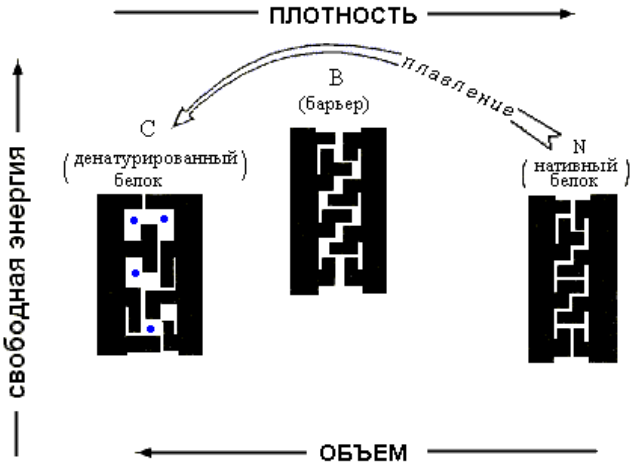


Рисунок 10.5. Изменение переменных в процессе плавления белка

Расплавленное состояние белка – является промежуточным. В этот момент связи в глобуле связи уже нарушились, но связуемые части не разошлись. Недавние эксперименты показали, что расплавленное состояние – одно из условий функционирования белка, в которое он переходит для изменения конформации, однако, достигается оно не за счет нагревания – фермент.

Виды взаимодействий в белковой молекуле:

1. Ван-дер-вальсовые

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

2. Водородные связи
3. Электростатические
4. Торсионный потенциал вращения отдельных атомных групп
5. Гидрофобные связи

Ван-дер-ваальсовые взаимодействия

Рассмотрим взаимодействие двух диполей, расположенных вдоль одной прямой (рис.10.6). Эти диполи ориентируются друг с другом. Расстояние между одноименными зарядами возьмем равное R. Это расстояние будет больше, чем между разноименными зарядами, поэтому, они будут притягиваться на коротких расстояниях.

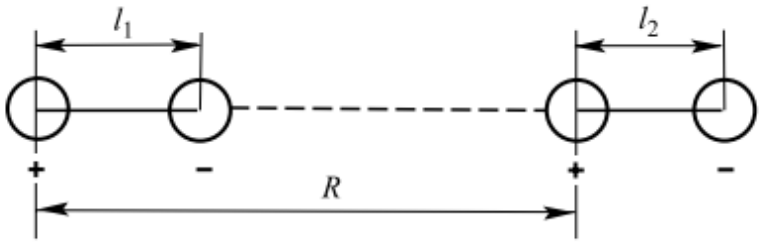


Рисунок 10.6. Взаимодействие двух диполей на прямой.

По закону Кулона, энергия ориентационного взаимодействия диполей, ориентированных так, как показано на рисунке, будет равна:

$$U_{op}(R) = -\frac{e^2}{R-l_1} - \frac{e^2}{R-l_2} - \frac{e^2}{R+l_1-l_2} - \frac{e^2}{R} \qquad (10.5),$$

где e – заряд электрона,
l_1, l_2 *– расстояние между противоположными зарядами*
и при $R \gg l_1, l_2$

$$U_{op}(R) = -\frac{2e^2 l_1 l_2}{R^3} \qquad (10.6)$$

Дипольные моменты P_1 и P_2 равны соответственно:

$$P_1 = el_1 \qquad P_2 = el_2 \qquad (10.7)$$

Подставив дипольные моменты в уравнение 64, получим:

$$U_{op}(R) = -\frac{2P_1P_2}{R^3} \qquad (10.8)$$

В случае усреднения по всем возможным ориентациям, получим:

$$U_{op}(R) = -\frac{2P_1^2P_2^2}{3K_BTR^6} \sim \frac{1}{R^6} \qquad (10.9)$$

где K_B *– константа Больцмана*

Таким образом, при увеличении расстояния, взаимодействие между диполями резко ослабевает.

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

В случае, если частицы не имею постоянных дипольных моментов, возможно дисперсионное взаимодействие Ван-дер-ваальса. Оно возникает за счет взаимодействия внешних электронов и является результатом появления «мгновенных» диполей.
Энергия электрона равна:

$$E_n = \left(n + \frac{1}{2}\right) \hbar\omega_0 \quad (10.10)$$

где n – главное квантовое число, ħ – постоянная Планка,
ω_0 – частота колебаний
Если n = 0 (нулевой уровень), то энергия электрона:

$$E_n = \frac{1}{2} \hbar\omega_0 \quad (10.11)$$

нулевая энергия
В квантовой механике существует соотношение неопределенности, которое гласит, что частица не обладает одновременно точным положением и импульсом. Этот принцип, принцип неопределенности Гейзенберга, сформулирован следующим образом:

$$\Delta x \cdot \Delta p \cong \hbar \quad (10.12)$$

Иными словами, существуют колебания электрона, которые связаны с быстрыми движениями и смещениями заряда из положений равновесия, а следовательно, с появлением «мгновенных дипольных моментов.
Можно представить механическую аналогию: два связанных между собой маятника висят на нитях, подвешенные к твердой балке (рис.10.7). Энергия взаимодействия электронов выражается следующим образом:

$$E = E_+ + E_- = \hbar\omega_0 \left(1 - \frac{e^4}{2f^2R^6}\right) \quad (10.13)$$

Таким образом, энергия наведенных диполей тоже обратно пропорциональна расстоянию в шестой степени. Из этого следует, что энергия дисперсионных взаимодействий Ван-дер-ваальса это величина порядка 1-3 ккал/моль. При этом, энергия тепловых колебаний ~ 0,6 ккал/моль. Таким образом, получается некое подвижное равновесие.

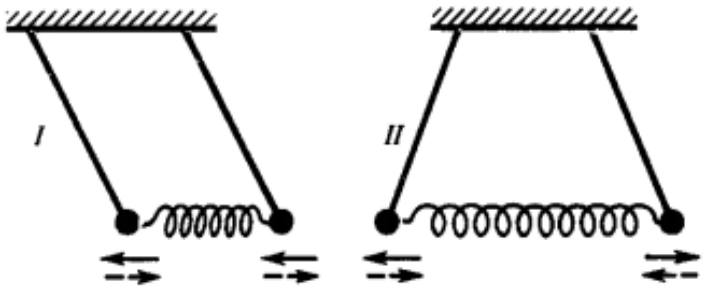


Рисунок 10.7. Симметричные (I) и несимметричные колебания (II) связанных маятников

Из вычислений выше понятно, что сила Ван-дер-ваальса зависит от расстояния. Важно, что при сближении слишком близко – возникает отталкивание, т.к. в электронной оболочке должны находиться электроны с разными квантовыми числами. Это

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

отталкивание возникает на очень коротких расстояниях, оно обратно пропорционально R^{12}. Суммарная энергия взаимодействия:

$$U(R) = -\frac{A}{R^6} + \frac{B}{R^{12}} \quad (10.14)$$

При сложении двух парабол, получим график с минимумом на расстоянии Ван-дер-ваальсовского радиуса – это расстояние, ближе которого атомы не подходят друг к другу и то расстояние, на которое подходят отдельные атомные группы в белках у отдельных аминокислот (рис. 10.8).

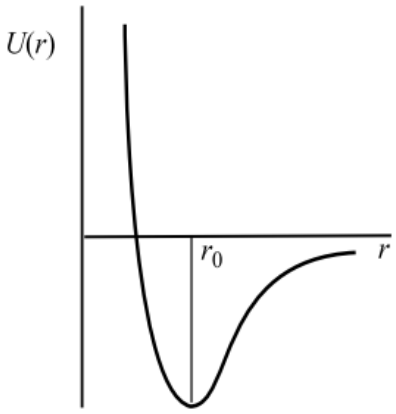


Рисунок 10.8. Типичный вид зависимости энергии взаимодействия от расстояния

Примеры R_0 для разных пар атомов:

- C - - C $R_0 \sim 0{,}32$нм
- C - - O $R_0 \sim 0{,}28$нм
- H - - H $R_0 \sim 0{,}2$нм

Это чуть больше средних длин хим. связей.

Торсионный потенциал вращения

Возьмем молекулу этана. Она имеет цис- и транс- положения (рис. 10.9).

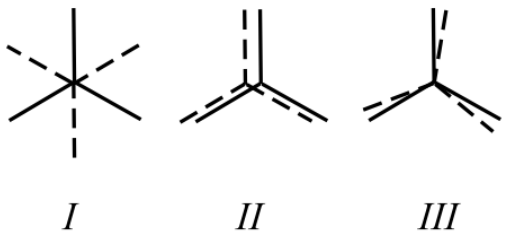


Рисунок 10.9. Расположение CH-связей этана в транс- (I), цис- (II), и промежуточной (III) конформациях (проекция на плоскость, перпендикулярную C-C связям)

Водороды в этане взаимодействуют друг с другом. В цис-положении они находятся ближе друг к другу, начинают отталкиваться и переводить молекулу в транс-конформацию. Поэтому, энергия взаимодействия будет зависеть от поворота (рис.10.10).

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

Значения углов 0 и 120º соответствуют транс положению, значения 60º, 180º и т.д. – цис-конформации.

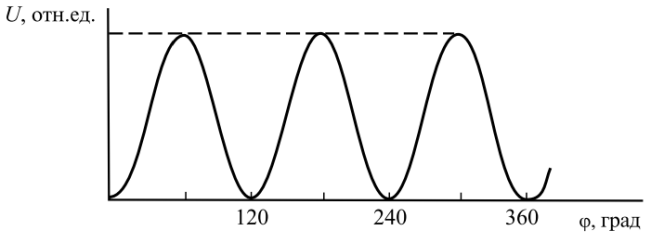


Рисунок 10.10. Зависимость потенциальной энергии внутреннего вращения в этане от угла поворота

Барьер цис-положения составляет примерно 3ккал/моль. Такой барьер при комнатной температуре молекула преодолевает каждые 10^{-10} сек.

Перейдем к белку. Возьмем одинарную связь (назовем ее i) и две прилегающие группы (i_{-1} и i_{+1}) (рис. 10.11). Эту систему можно сравнить с книгой, где центральная связь – корешок книги, а две другие связи – ее страницы. Тогда угол вращения будет эквивалентен углу между этими страницами.

Энегрия взаимодействия здесь зависит от угла и рассчитывается по выражению:

$$U = \frac{1}{2}U_0(1 - cos3\varphi) \qquad (10.15)$$

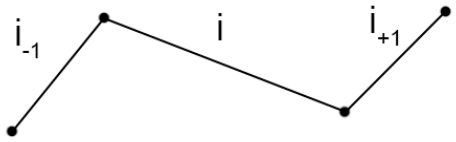


Рисунок 10.11. Рассматриваемая совокупность связей

Кооперативные взаимодействия дальнего порядка

Энергия всей цепочки не будет равна сумме энергий отдельных ее частей из-за наличия кооперативных взаимодействий дальнего порядка.

$$E\{\varphi\} \neq \sum E(\varphi_i) \qquad (10.16)$$

Можно провести сравнения с людьми, подпрыгивающими на месте. В случае, если много людей совершают прыжок поодиночке, то их суммарную кинетическую энергию можно посчитать из суммы энергий каждого человека. Однако, взявшись за руки, люди будут мешать друг другу, влияя на энергию соседа при прыжке.

Однако, конформационную энергию можно рассчитать иначе:

$$E\{\varphi\} = \sum_{i=2}^{n-1} E_i(\varphi_{i-1}, \varphi_i) \qquad (10.17)$$

Рассмотрим полипептидную цепочку (рис. 10.12).

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

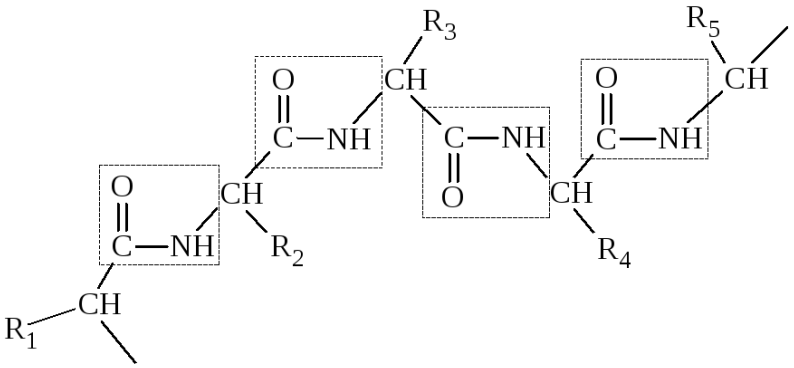


Рисунок 10.12. Пример полипептидной цепи

Каждая пептидная связь C-N в молекуле белка имеет примесь двойной (рис. 10.13).

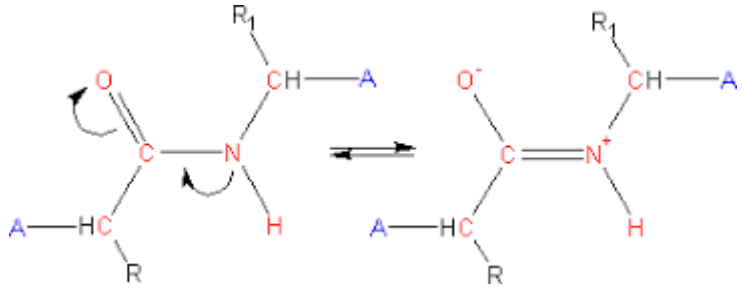


Рисунок 10.13. Равновесие между одиночной и двойной связями между атомами C и N

Пересечение p-орбиталей происходит лучше в случаях, когда все эти связи находятся в одной плоскости (рис. 10.14).

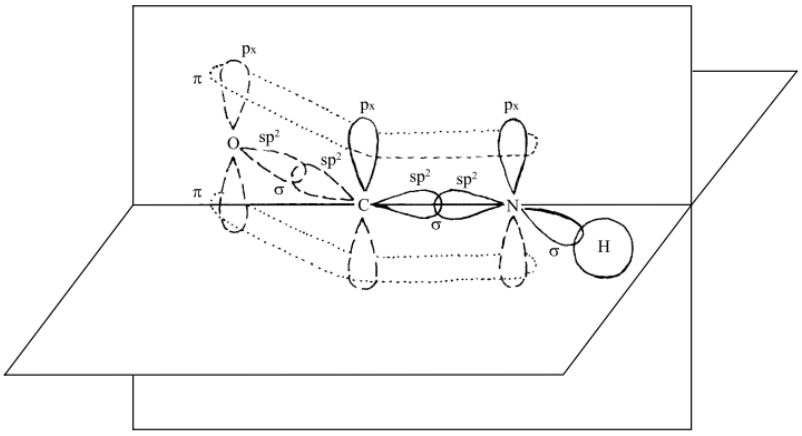


Рисунок 10.14. Электронная конфигурация полипептидной цепи

Полученная система двойных связей достаточно тяжело вращается, поэтому, белковая система, фактически, представляет собой систему с изолированными парами вращения (рис. 10.15).

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

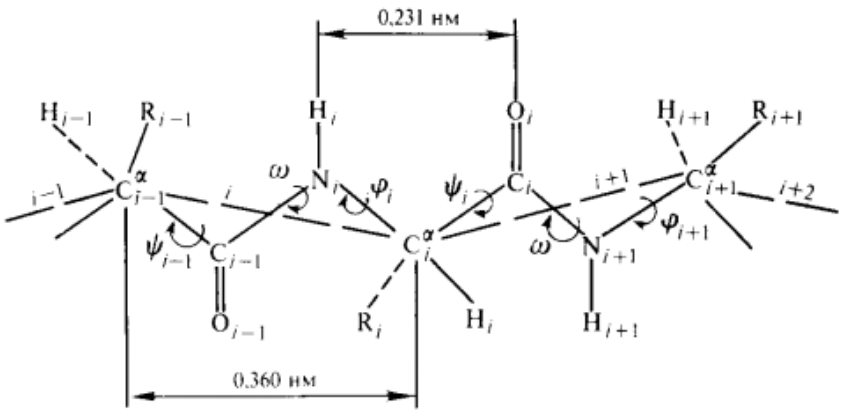


Рисунок 10.15. Пространственная конфигурация полипептидной цепи.

Эти вращения совершаются вокруг одинарных связей и поэтому можно посчитать зависимость энергии взаимодействия от двухгранных углов φ и ψ.

$$E(\varphi,\psi) = \frac{1}{2}E_{\varphi}^{0}(1 - cos3\varphi) + \frac{1}{2}E_{\psi}^{0}(1 - cos3\psi) + \sum E_{w.w.}(R) + E_c \qquad (10.18)$$

где E_c – энергия кулоновских взаимодействий,
$E_{w.w.}$-энергия взаимодействий Ван-дер-Ваальса

Возьмем дипептид метиламид-N-ацетил-L-аланин (рис. 10.16).

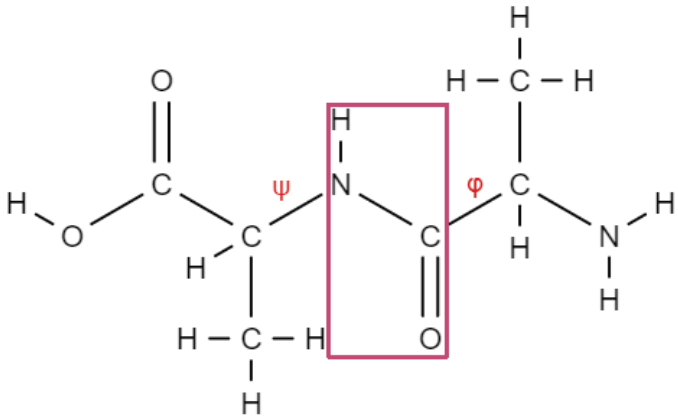


Рисунок 10.16. Молекула метиламида-N-ацетиламинокислоты в плоской конформации

При вращении групп этой молекулы, энергия из взаимодействия будет зависеть от их положения. Берется условно, что каждая группа может занимать 10 различных положений. Тогда, для этого дипептида можно посчитать зависимость энергии взаимодействия от двухгранных углов поворота вокруг единичных связей. У дипептида аланина, в этом случае, получится два минимума, что соответствует действительности. Энергия минимумов находится глубже энергии тепловых колебаний, но переходы все еще возможны.

Если рассчитать вероятности нахождения молекул в различных состояниях мы увидим два отчетливых пика, что тоже согласуется с реальностью.

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

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

Молекула метиламида-N-ацетилаланина будет иметь уже три минимума. Его конформационная карта представлена на (рис. 10.17).

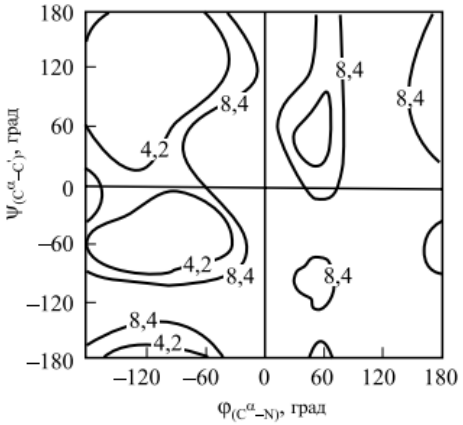


Рисунок 10.17. Конформационная картам молекулы метиламида-N-ацетилаланина

Глубина энергии в минимумах будет составлять 1-2ккал/на моль, что тоже больше энергии тепловых колебаний примерно в 2-4 раза.

При помощи этого метода можно на основании первичной структуры белка определить вторичную.

Белок – уникальная молекула. Для белка длинной 200 аминокислот можно составить 20^{200} комбинаций последовательностей, что существенно превышает порядок существующих нативных белков (10^5). Возникает вопрос, почему именно эти 10^5 нативных белков закрепились в эволюционном процессе. На него есть несколько ответов:

1. Выполнение принципа запоминания случайного выбора. Для этого нужно создать случайную комбинацию и ее запомнить. Этот процесс аналогичен выбору ячейки для хранения вещей. Они все равнозначны для нас, однако, случайный выбор ячейки и ее запоминание создает информацию.
2. Последние работы показывают, что основные последовательности, по-видимому, отличаются друг от друга какими-то особыми свойствами

Существует два способа предсказания вторичной структуры:

1. Расчетный
2. Статистический

Суть статистического метода в том, что каждая аминокислота может быть элементом какой-либо вторичной структуры (либо α-спирали, либо β-листа). Статистика говорит, что с какой-то вероятностью каждая аминокислота входит в один из этих элементов. Потом, при помощи минимизации энергии, их состояния уточняют, постепенно предсказывая вторичную структуру. Этим методом было правильно выполнено около 80% предсказаний, т.е. они явно не случайные.

Возьмем основную последовательность и начнем ее сворачивать. При встрече различных аминокислот начинаются взаимодействия между ними. В случае, если энергия взаимодействия меньше, чем энергий тепловых колебаний, то они разрушаются.

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

Те вторичный структуры, которые зарождались на этапе сворачивания, не разваливались в процессе дальнейшего сворачивания. Рассмотрим процесс сворачивания белковой глобулы (рис. 10.19). Для расчета необходимо учесть эту схему, т.к. она указывает на последовательность их выполнения.

При расчете структур макромолекул, на первом этапе рассчитывают структуры пар и трипептидов (рис. 10.20). На следующем этапе складываются конформации более длинных последовательностей. При этом, при укладке, трипептиды становятся участниками набора низкоэнергетических конформаций следующего этапа, который становится сильно ограничен.

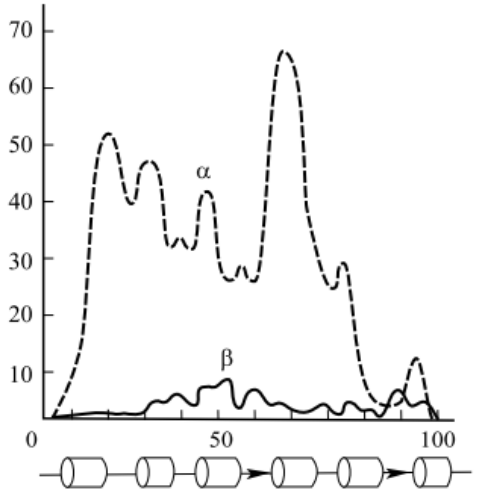


Рисунок 10.18. Вторичная структура развернутой цепи кальций-связывающего белка мышц карпа на 1-й стадии самоорганизации

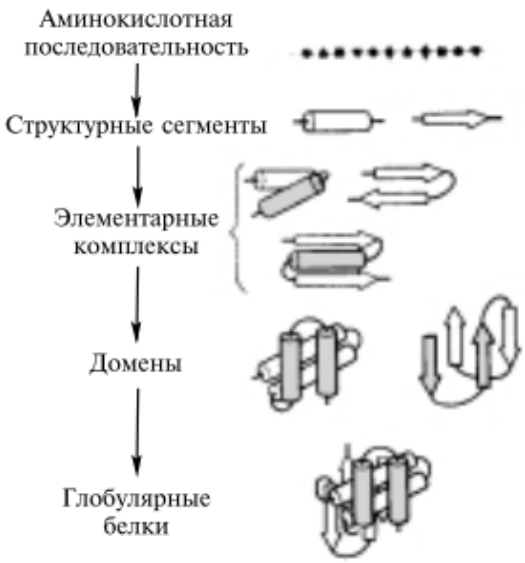


Рисунок 10.19. Иерархия структуры белка и последовательность его сворачивания

Возникает закономерный вопрос, на чем основывается выбор первых элементов сборки. На самом деле, выбор этих комбинаций не имеет значения, т.к. работает принцип согласованности ближних и дальних взаимодействий. Наши расчеты просто сужают поиск, при определении низкоэнергетической конформации.

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

Посмотрим еще раз на процесс сворачивания цепи (рис. 10.21). Допустим, в начале произошла случайная встреча аминокислот с образованием вторичной структуры. При дальнейшем сворачивании, при любом сворачивании, элемент, появившийся на первом этапе, сохраняется.

Проблема фолдинга белка остается актуальна уже на протяжении 50- лет и остается актуальна по сей день.

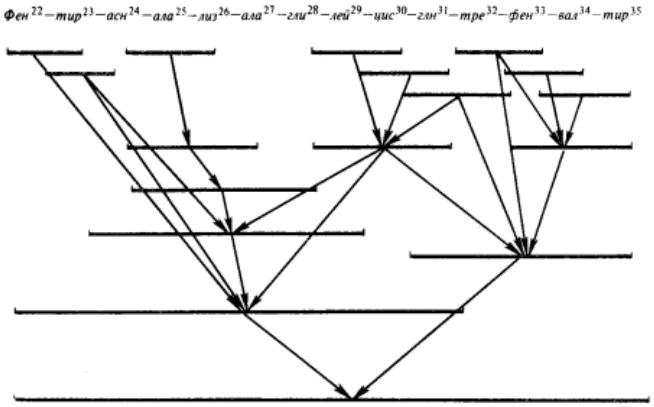


Рисунок 10.20. Последовательность учета межпептидных взаимодействий при расчете фрагмента фен-22 - тир-35 БПТИ

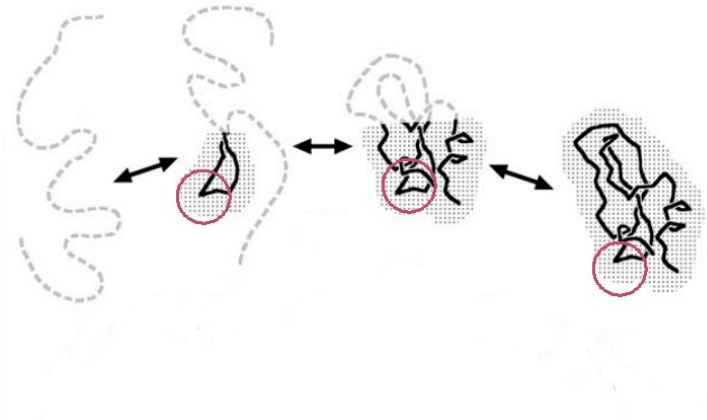


Рисунок 10.21. Процесс поэтапного фолдинга белка

В процессе фолдинга будет уменьшаться число микросостояний. Этот эффект называют принципом Асфинсена (Anfinsen). Денатурированный белок при температуре T_θ способен образовывать полукомпактную глобулу достаточно быстро. В этом состоянии белок представляет из себя расплавленную глобулу. Температура этого процесса обозначим T_f. После этого происходит «стеклование» белка с образованием нативной глобулярной структуре, этот процесс проходит при наименьшей температуре T_c.

Ошибка при выборе температуры фолдинга будет приводить к проблемам:

1. При слишком маленькой температуре процесс фолдинга будет проходить очень медленно
2. При большой температуре фолдинг будет проходить быстро, но образовавшиеся структуры будут разваливаться

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

Рассмотрим процесс сворачивания с точки зрения энергетики (рис. 97). Самую низкую энергию имеет глобула (N), как U обозначена внутренняя энергия клубка, а M – конкурирующие промежуточные состояния. Из графика видим, сто процесс самосборки возможен при условиях, когда глобула будет стабильнее, чем клубок. При этом все конкурирующие состоянии должны быть менее стабильны, как и на рисунке.

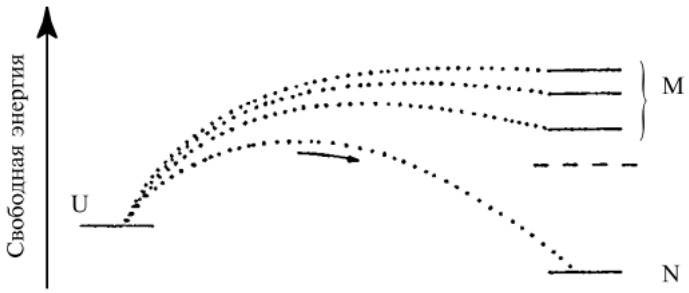


Рисунок 10.22. Энергетические уровни различных состояний на пути сворачивания белка.

В процессе сворачивания белка, согласно принципу согласованности ближних и дальних взаимодействий, структуры образуются случайным образом, но, не разрушаются они по причине, что энергия тепловых колебаний не способна из разорвать. Так, если наша структура сворачивается, в ней образуются контакты и нужные контакты фиксируются. Количество контактов, фиксированных в нужной конформации должно расти, а общее число контактов должно к нему приближаться.

Таким образом, белок образуется не путем простого перебора (это бы было очень долго), а за счет того, что с самого начала образуются необходимые контакты (точнее, эти контакты не разваливаются, как остальные).

Парадокс Левинталя – парадокс, сформулированный американским молекулярным биологом. Для его описания представим, что в белке нет направленного сворачивания и мы образуем нативный белок путем перебора. При сворачивании белка происходит падение энтропии из-за роста упорядоченности и одновременное падения энергии вследствие образования контактов между сближающимися звеньями (10.19).

$$\Delta F = \Delta U - T\Delta S < 0 \qquad (10.19)$$

Тогда на достижение какой-либо пробной конформации будет затрачено время:

$$\tau \sim \exp(\frac{\Delta F^*}{RT}) \sim 1 \text{ нс}$$

Если белок имеет N звеньев, и каждая из них может принять 10 энергетических конформаций, то всего конформаций 10^N. Тогда если возьмем N=58, то мы получим время:

$$10^N \sim 10^{58} \text{нс} \sim 10^{41} \text{лет}$$

Что превышает время существования вселенной. Реально, белок сворачивается за секунды, что говорит о направленности процесса.

Энергетический профиль может дать ответ на вопрос о правильном соотношении между скоростью сворачивания и стабильностью нативной структуры (рис. 10.23).

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

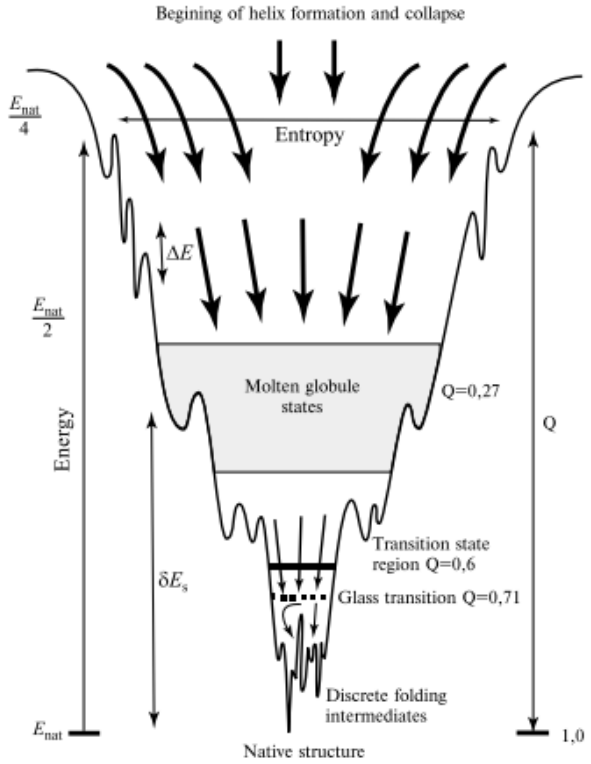


Рисунок 10.23. Схема "воронки скатывания" для быстрого сворачивания спирального белка из 60 аминокислотных остатков

ΔG – уменьшение термодинамического потенциала за счет образования связей, должно быть сильно больше $k_в T$, поэтому температура фолдинга берется выше температуры стеклования.

Рассмотрим результат по моделированию динамики сворачивания случайных последовательностей.

Для этого взяли кубическую решетку с 27-ю элементами – фрагментами цепи и начали считать энергии взаимодействия на разных расстояниях (рис. 10.24).

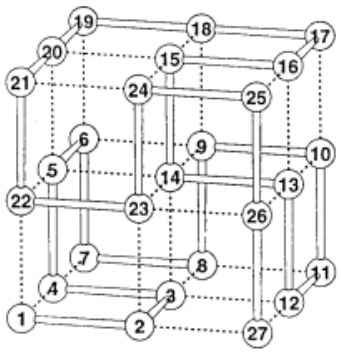


Рисунок 10.24. Решетчатая модель скручивания белка

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

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

В ходе этого эксперимента было оценено время сворачивания. При моделировании было показано, что одни последовательности сворачивались быстро, а другие – медленно. И те, что свернулись быстро в своем спектре имели зазор между нативной структурой и последним этапом сворачивания (рис. 10.25).

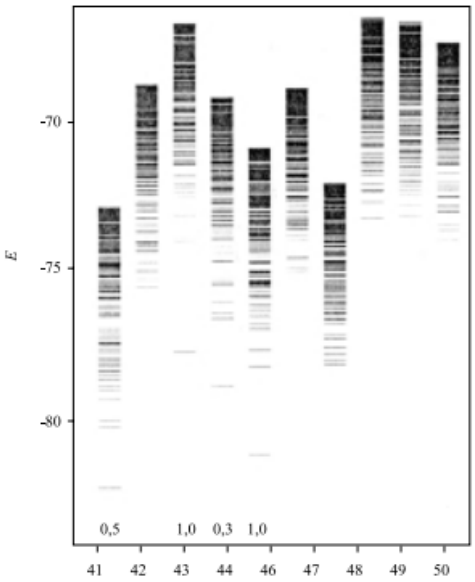


Рисунок 10.25. Энергетический спектр для 10 сворачивающихся и несворачивающихся последовательностей (первые 4)

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

Лекция 7

Исследование активности нейронов in vivo

Применяемые методы:

1. Электрофизиология.
2. Исследование кальциевой активности в нейронах.

С помощью электрофизиологических методов можно изучать отдельные клетки, вставляя в них электрод напрямую или погружая в экстраклеточную среду коры для замера изменения потенциала за счет протекающих там неравновесных токов. Электрические методы достаточно точные, однако, в случае изучения живого существа мы не будем знать, в какую именно клетку попал электрод, хотя, сможем понять некоторые свойства изучаемого нейрона

Исследование кальциевой активности - наиболее популярный метод исследования активности нейронов. Когда нейрон генерирует потенциал действия, за счет работы потенциалзависимых кальциевых каналов, изменяется его концентрация внутри клетки. Кроме того, флуоресцентные зонды на кальций лучше зондов на другие ионы – они достаточно быстры и избирательны. Одним из самых распространенных зондов является Oregon Green, которым можно окрашивать кору. При наличии кориального окна в черепе краситель можно просто налить на ткани, и он окрасит нейроны и астроциты. Для отделения астроцитов, в свою очередь, применяют специальные красители.

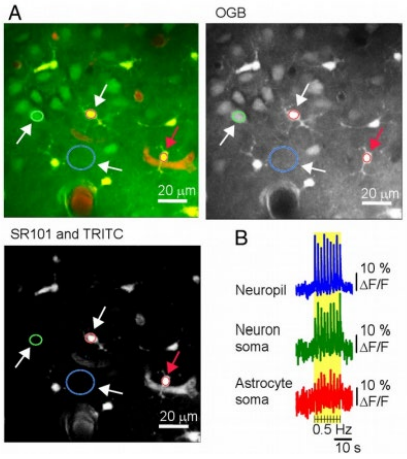


Рисунок 11.1. Препарат мозга грызуна, окрашенный при помощи флуоресцентных красителей. Зеленым окрашены нейроны, желтым – астроциты, из-за добавления красного специфичного красителя

Изучать такие ткани можно при помощи двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии, которая позволяет сканировать более глубокие слои мозга по сравнение с конфокальной.

На вышеописанном препарате можно, стимулируя сенсорную область мозга животного, например, касанием вибрис, изучать активность нейронов и глиальных клеток, которая отражается в изменении концентрации кальция.

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

Если животное имеет прозрачные покровы, при помощи подобных красителей можно узнать структуру всей его нервной системы (рис.11.2). Этот препарат покрашен относительно функциональных тестов.

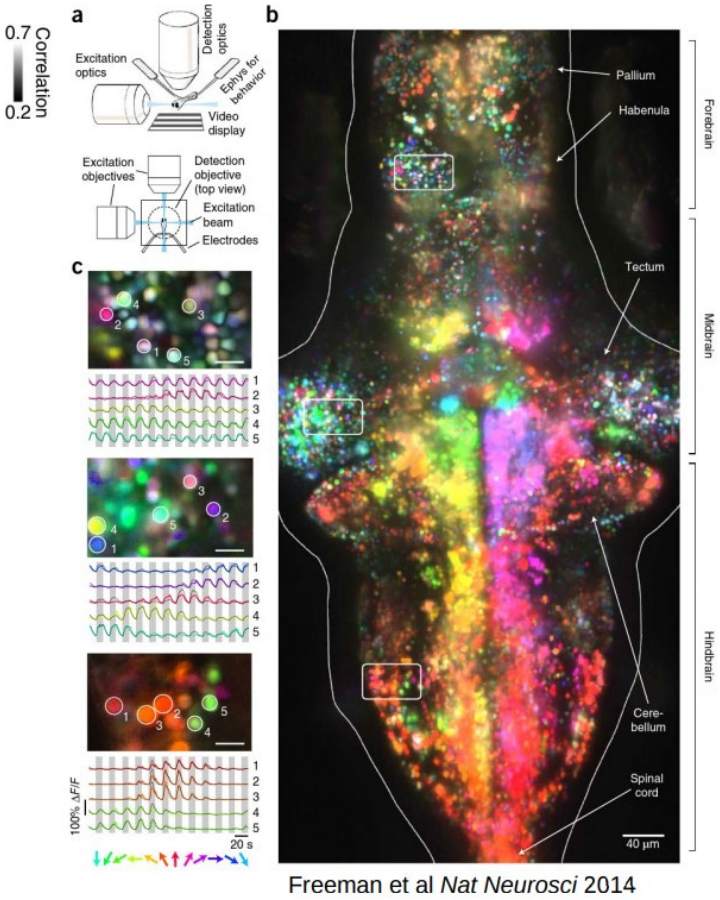


Рисунок 28. Снимок окрашенного мозга личинки Danio reria

Еще более избирательным методом является использование генетически кодируемых кальциевых репортеров, молекул флуоресцентного белка, который чувствителен к концентрации кальция. Эти белки можно ставить под специфические промоторы, что позволяет задействовать нейроны только определенного типа.

Метод функционального ядерного магнитного резонанса fMRI.

fMRI позволяет исследовать измерение локального кровотока в ткани. Дело в том, что для активности нервных клеток затрачивается большое количество АТФ и при активности клеток затраты АТФ увеличиваются по сравнению с состоянием покоя. Для компенсирования этих затрат и эффективного обеспечения кислородом, происходит локальное увеличение кровотока. Принцип метода в том, что молекула гемоглобина по-разному реагирует на магнитное поле в зависимости от того, связан ли он с кислородом (так называемый BOLD signal).

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

Если мы возьмем небольшой участок коры и покрасим на нем артериолы, венулы и капилляры, то увидим, насколько это плотная разветвленная сеть (рис. 11.3). По поверхности мозга идут пиальные артерии и от них идут проникающие, доходящие практически до белого вещества.

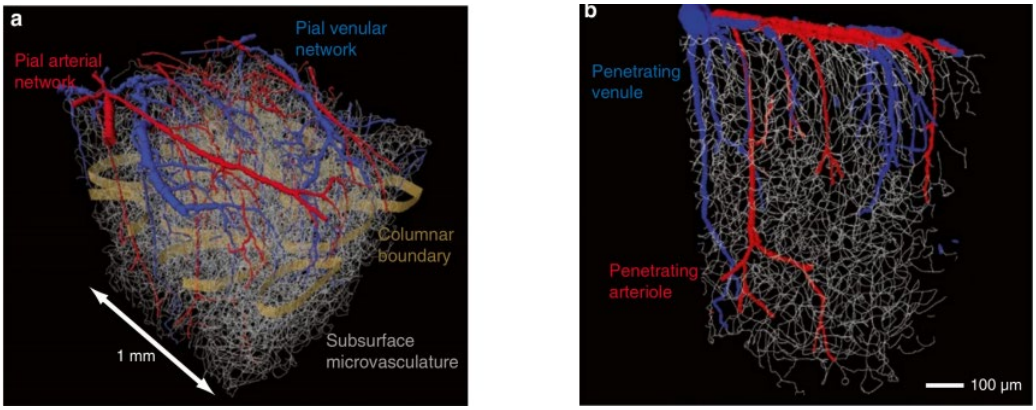


Рисунок 29. Окрашенная сеть кровеносных сосудов в мозге

Используя методы флуоресцентной микроскопии, можно локально исследовать изменения кровотока, увидеть изменения диаметра одиночного сосуда и скорость движения эритроцитов по ним. Суть метода, следующая. Производится последовательное сканирование артериолы вдоль ее хода и поперек. Тогда из картинки, сделанной при сканировании поперек, можно увидеть изменения диаметра, а из данных, полученных при сканировании вдоль можно увидеть наклонные полоски – треки отдельных клеток крови. По углу треков можно определить скорость движения эритроцитов (рис. 11.4).

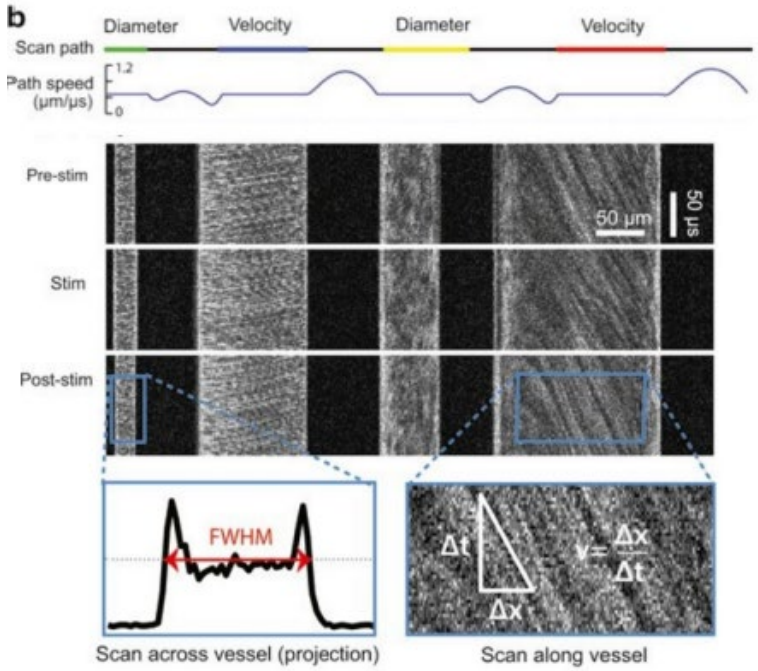


Рисунок 30. Изображения треков эритроцитов при продольном сканировании

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

Зная скорость эритроцитов и диаметр сосуда можно высчитать поток крови и можно увидеть, как он увеличивается в ответ на возбуждение.

Скорость локального кровотока можно измерить и при помощи метода Laser doppler:

1. Световод испускает лазерный луч
2. Движущиеся частицы отражают свет лазера
3. Длинна волны отраженного света будет зависеть от скорости частиц, благодаря эффекту Доплера

Важно подчеркнуть, что увеличение кровотока большое, чем увеличение потребления энергии. Так, локальный кровоток увеличивается максимум в полтора раза, когда скорость потребления кислорода в ткани, получаемую измерением парциального давления кислорода кислородным микроэлектродом, не превышает 30% (рис 11.5).

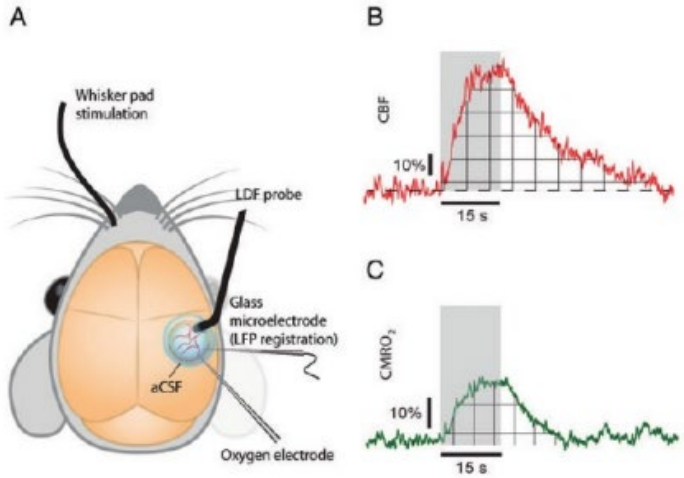


Рисунок 31. Графики изменения потребления энергии и увеличения кровотока в нервной ткани

Существую ограничения, не позволяющие мозгу увеличивать затраты АТФ. К примеру, мышцы, которые тратят в покое в разы меньше энергии, могут увеличивать свой кровоток в несколько раз за счет увеличения из объема. Объем мозга ограничивается черепной коробкой, поэтому нейроны невозможно, даже локально, заставить увеличить свой кровоток в несколько раз.

В случаях, если расход энергии превышает доступный объем, проявляется феномен, называемый Cortical spreading depression (CSD) – распространяющаяся кортикальная депрессия. В этом случае нейрон не способен поддерживать градиенты нейронов и постепенно теряется потенциал на мембране (рис. 11.6). Возникающая деполяризация приводит к выбросу нейромедиатора глутамата. Глутамат накапливается в ткани, чрезмерно активирует соседние нейроны через NMDA-рецепторы, вызывая в них активацию. Эти нейроны, в свою очередь активируют соседние нейроны больше, чем те могут обработать, запуская таким образом лавинообразную реакцию. Такие состояния массовых потерь градиентов часто встречаются в травматических зонах.

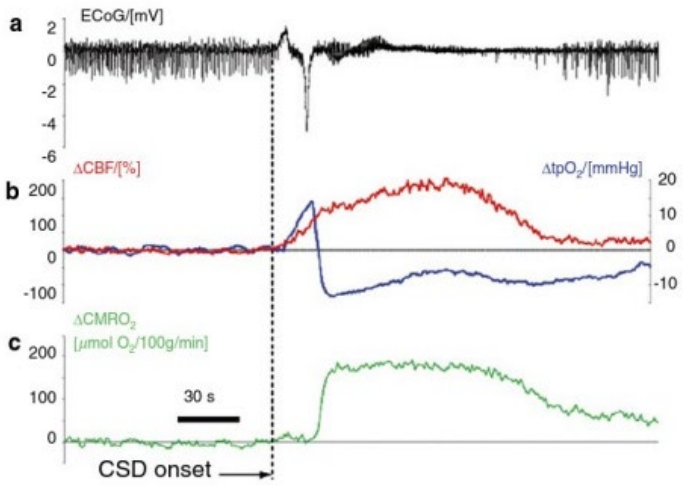


Рисунок 32. Кривые парциального давления кислорода, локального кровотока, энергопотребления и изменения ПД нейрона при кортикальной депрессии

Потребление энергии мозгом, его устройство и морфология

Рассмотрим энергопотребление мозга мыши и частично перенесем эти прикидочные расчеты на человека.

При помощи радиоавтографическим меток, когда меченый изотопом непереваривaемый метаболит, сходный с глюкозой, накапливается в тканях, можно судить о потреблении этой тканью глюкозы.

Кора мыши:

1,1-1,6 $\frac{\text{ммоль глюкозы}}{\text{г·мин}}$ (ммоль глюкозы потребляемое граммом ткани в минуту).

Если рассчитывать, что из одной молекулы глюкозы получается 30 молекул АТФ, то получится:

33-50 $\frac{\text{ммоль АТФ}}{\text{г·мин}}$

Мозг мыши в среднем будет потреблять в среднем меньше, т.к. в белом веществе тратится меньше АТФ:

$\sim 0{,}7$ $\frac{\text{ммоль глюкозы}}{\text{г·мин}}$ или ~ 21 $\frac{\text{ммоль АТФ}}{\text{г·мин}}$.

Если учитывать, что на работу Na/K-насоса тратится примерно половина всей энергии, то ~ 10 $\frac{\text{ммоль АТФ}}{\text{г·мин}}$ тратится на хозяйственные нужды.

Кора человека потребляет меньше глюкозы:

$\sim 0{,}4$ $\frac{\text{ммоль глюкозы}}{\text{г·мин}}$ и, соответственно, ~ 12 $\frac{\text{ммоль АТФ}}{\text{г·мин}}$

И весь мозг потребляет:

$\sim 0{,}3$ $\frac{\text{ммоль глюкозы}}{\text{г·мин}}$ и, соответственно, ~ 9 $\frac{\text{ммоль АТФ}}{\text{г·мин}}$, что соответствует 20% от общего потребления всего организма в покое.

Морфология неокортекса:

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

Под 1 мм коры располагается около 10^5 нейронов. Рассмотрим сравнение морфологии неокортекса мыши и человека (табл. 3)

	Мышь	Человек
Астроциты	$9{,}2 \cdot 10^4$ /мм^3	$38 \cdot 10^3$ /мм^3
Нейроны		$40 \cdot 10^3$ /мм^3
Синапсы	$8 \cdot 10^3$ /нейрон	$7 \cdot 10^8$ /мм^3
Аксоны	$\text{L}\sim 40 \frac{\text{мм}}{\text{нейрон}}$ $\emptyset - 0{,}3\text{м}$	$\text{L}\sim 100 \frac{\text{мм}}{\text{нейрон}}$ $\emptyset - 0{,}3\text{м}$
Дендриты	$\text{L}\sim 44 \frac{\text{мм}}{\text{нейрон}}$ $\emptyset - 0{,}9\text{м}$	$\text{L}\sim 10 \frac{\text{мм}}{\text{нейрон}}$ $\emptyset - 0{,}9\text{м}$
Средняя частота ПД	4 Гц	10 Гц

Таблица 3. Морфология неокортекса мыши и человека в сравнении

$\emptyset$ –диаметр отростков, приходящийся на один нейрон
L – длина отростков, приходящаяся на один нейрон
80-90% нейронов – пирамидальные клетки
Около 90% всех синапсов – глутаматэргические.

Потенциал покоя

Потенциал покоя определяется ионами Na^+ и K^+, градиент которых создается соответствующей АТФазой. Тогда утечка этих ионов в покое должна компенсироваться ее работой. Учитывая стехиометрию процесса переноса (3 Na^+ / 2 K^+), можно вывести следующие выражения, для оценки затрат АТФ:

$$\text{Затраты АТФ } \left[\frac{\text{молекул}}{\text{с}}\right] = \frac{(V_{Na}-V_r)(V_r-V_K)}{FR_{in}(V_r+2V_{Na}-3V_K)} N_A \quad (77)$$

где V_r- потенциал покоя, R_{in} - входное сопротивление нейрона,
F – число Фарадея

$$R_{in} \approx \frac{1}{g_{Na}+g_K} \quad (78)$$

Величины участвующих потенциалов:
$V_r \approx -70\, mV$
$V_{Na} \approx +50\, mV$
$V_K \approx -100\, mV$

Входное сопротивление нейрона для мыши будет составлять примерно 35-150 Мом, года количество затрачиваемых молекул АТФ будет равно:

$$\sim 5 \cdot 10^8 \frac{\text{молекул АТФ}}{\text{с} \cdot \text{нейрон}}$$

Примерно в 5 раз меньше будут тратить клетки глии, т.к. их потенциал покоя практически совпадает с потенциалом покоя по K^+.

У человека нейроны крупнее, чем у мыши, и, соответственно, возрастет энергопотребление:

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

$R_{in} \approx 40$МОм

$\sim 1{,}3 \cdot 10^9 \frac{\text{молекул АТФ}}{\text{с} \cdot \text{нейрон}}$

Затраты на проведение ПД:

Для оценки необходимо рассчитать число ионов натрия, которые должны перейти через мембрану, для изменения потенциала на величину, характерную для ПД, и умножить полученную величину на длину нейрона. Число зарядов пропорционально емкости и величине изменения потенциала:

$q = C \cdot \Delta V$ (11.1)

И тогда:

$N_{\text{ионов}} = \frac{q}{F} N_A = \frac{C\Delta V}{F} N_A$ (11.2)

Удельная емкость составляет около 1мкФ/см^2, $\Delta V \approx 100$ mV.

Из длинны и диаметра дендритов и аксонов можем рассчитать их полную площадь, по которой можно рассчитать полную емкость. Тогда получим следующие значения для мыши и человека (рис. 11.7).

Площадь нейрона, тело + аксон	$3.90*10^{-4}$ [cm^2]	Площадь нейрона, тело + аксон	$9.55*10^{-4}$ [cm^2]
Входит ионов Na+ (минимум)	$2.42*10^{8}$	Входит ионов Na+ (минимум)	$5.94*10^{8}$
Площадь дендритов	$1.24*10^{-4}$ [cm^2]	Площадь дендритов	$2.83*10^{-4}$ [cm^2]
Входит ионов Na+ (минимум)	$3.87*10^{7}$	Входит ионов Na+ (минимум)	$8.79*10^{7}$
Затраты на проведение ПД на нейрон	**$1.17*10^{8}$ АТФ/ПД**	**Затраты на проведение ПД на нейрон**	**$2.84*10^{8}$ АТФ/ПД**

Рисунок 33. Расчет затрат АТФ на проведение ПД

Безусловно, основные ПД генерируются и проводятся аксонами, но часть из них распространяется ретроградно через дендриты и деполяризует сому.

Затраты на синаптическую передачу:

При генерации ПД синаптическое окончание может выбросить везикулы с медиатором. В свою очередь медиатор в этих везикулах появился за счет работы обменников H^+/Glu, а протонный градиент – за счет работы помп. На постсинаптической мембране находится некоторое количество NMDA (меньше) и AMPA (больше) рецепторов. По разным оценкам можно предположить, что на каждая везикула активирует 20 AMPA рецепторов. Проводимость одного AMPA рецептора примерно 13pS или 1000 гигаОм – сопротивление одиночного канала. Грубо приблизить постсинаптические токи, то можно взять время прохождения тока через канал равное 1мс. Сам ток можно приблизительно определить из потенциала реверсии. Мы знаем, что рецепторы постсинаптической мембраны проводят и K^+ и Na^+, поэтому их потенциал реверсии находится между ними – примерно 0 mV. Примерно 2/3 всех проводимых ионов – Na^+. Соответственно, можно посчитать минимальное количество ионов Na^+ нужно для получения такого тока:

$I = Ng(V - V_{Na})$ (11.3)

$N_{\text{ионов}} = \frac{It}{F} N_A = 2 \cdot 10^5 \frac{Na}{\text{ВПСП}}$ (11.4)

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

Отсюда можем рассчитать количество АТФ – $6{,}7 \cdot 10^4 \frac{\text{АТФ}}{\text{ВПСП}}$

Есть еще и NMDA-рецепторы, имеющие большую проводимость, но количество которых меньше: $g \sim 50pS,\ t \sim 50ms$. Кроме натрия, они переносят еще и кальций, который необходимо после удалить. При расчете получится, что примерно такое же кол-во энергии тратится на работу NMDA-рецепторов.

Кроме всего этого, сколько-то АТФ тратится на метаботропные глутаматные рецепторы ($\sim 3000 \frac{\text{АТФ}}{\text{ВПСП}}$), сколько-то тратится на удаление кальция, плюс существуют затраты на выброс везикул (около 500 АТФ).

Если сложить затраты на все озвученные процессы, то получится следующее значение:

$\sum: 1{,}64 \cdot 10^5 \frac{\text{АТФ}}{\text{ВПСП}}$

Просуммируем расчетные затраты энергии в мозгу мыши. Если каждый нейрон дает около 8000 синапсов, частота ПД около 4 Гц, и если считать, что в ¼ случаях отдельный синапс выбросит везикулы с глутаматом, то получится, что на потенциал покоя тратится примерно $6 \cdot 10^8 \frac{\text{АТФ}}{\text{с}}$ и $1{,}8 \cdot 10^9 \frac{\text{АТФ}}{\text{с}}$ на проведение. Тогда умножив на число нейронов, получим значение $20{,}2 \frac{\text{ммоль АТФ}}{\text{г·мин}}$, что соответствует реальному потреблению.

Оценка для человека получается неправдоподобной. Если предполагать, что вероятность выброса медиатора у человека такая же, как у мыши, то при подстановке всех значений получим $42 \frac{\text{ммоль АТФ}}{\text{г·мин}}$, при реальном потреблении $12 \frac{\text{ммоль АТФ}}{\text{г·мин}}$.

Оптимизация затрат АТФ на уровне пресинаптической мембраны

Частоту генерации потенциала нельзя увеличить, т.к. потребление энергии может увеличиться максимум на несколько десятков процентов, т.к. большее не удастся покрыть за счет увеличения локального кровоснабжения. Из этого следует, что, зная входное сопротивление и суммарную емкость клетки, мы можем рассчитать константу времени нашего нейрона, отражающую частоту, с которой нейрон может менять мембранный потенциал. Тогда частота, которую нейрон может отфильтровывать, будет составлять сотни герц. Это значит, что при поступлении ПД с частотой выше сотен герц, нейрон не будет на них реагировать, т.к. мембрана не будет успевать изменять свой мембранный потенциал. Для увеличения предела частоты генерации мы должны уменьшить входное сопротивление, что вызовет увеличение энергии поддержания ПД и энергии его генерации. Подобное увеличение расхода недопустимо.

Для того, чтобы оценить эффективность обработки информации мозгом, нужно оценить объем информации. Один из самых простых подходов заключается в том, что для каждого отдельного нейрона его ПД можем рассматривать как стохастический процесс. Т.е. мы разбиваем время на отрезки и предполагаем, что на каждом из них с равной вероятностью может быть или не быть ПД. Т.к. большинство нейронов имеет максимальную частоту генерации в 400Гц, то возьмем отрезки времени равные

$\Delta t = 0{,}25ms$. В таком случае при вероятности генерации s=1 мы получим частоту равную 400Гц.

При рассмотрении такого стохастического процесса, мерой информации может служить энтропия Шенона, равная:

$H_s = -\sum_x P[x] log_2 P[x]$ (11.5)

При этом, x принимает только два значения: 0 – если ПД нет и 1 – если ПД есть. В таком случае нейрон несет максимум информации, при вероятности равной 0,5, что соответствует 200 Гц (рис. 11.8).

В норме генерируется в 50 раз меньше ПД. Если в r раз увеличиваются энергозатраты нейрона когда он генерирует ПД по сравнению с покоем, то можно вывести оптимальную вероятность генерации ПД:

$$r = \frac{log_2 S^*}{log_2(1-\delta^*)} \qquad (11.6)$$

где S^* - оптимальная вероятность генерации ПД

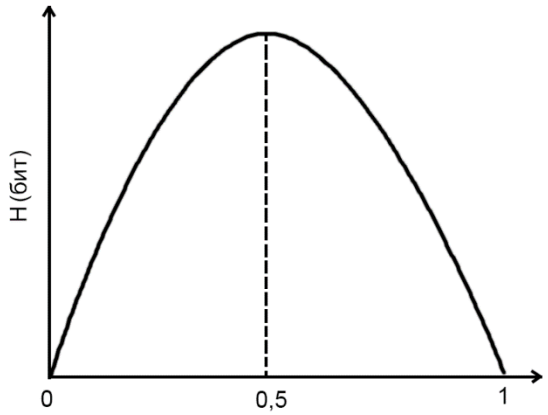


Рисунок 34. График зависимости количества информации от вероятности возникновения ПД

Из этой формулы, при r = 150 получается S^*=0,024, что примерно соответствует реальным частотам генерации нейронами коры. Но мы знаем, что многие аксоны образуют сразу несколько синапсов и каждый из них срабатывает далеко не всегда, а лишь в ¼ случаев.

Рассмотрим энтропию Шеннона при вероятности того, что нейрон находится в положении, при котором он готов активировать синапс:

$H_s = -\sum P[s] log_2 P[s]$ (11.7)

Тогда для рассмотрения взаимной информации между двумя процессами учтем, что при наличии необходимого состояния, аксон может не выбросить нейромедиатор. В качестве меры несвязности двух процессов можно взять вероятность отсутствия выброса медиатора при наличии спайка (P[s|r]):

$H_r = -\sum P[s|r] log_2 P[s|r]$ (11.8)

| - означает условную вероятность

Это можно просуммировать по всем вариантам, которые происходят с точки зрения выброса медиатора:

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

$H_{noise} = -\sum_{r,s} P[s]P[s|r]log_2 P[s]P[s|r]$ (11.9)

Взаимная информация между двумя процессами:

$I_m = H_s - H_{noise}$ (11.10)

$I_m = -\sum P[s]log_2 P[s] + \sum P[s|r]log_2 P[s|r]$ (11.11)

Кроме того, по теореме Байеса:

$$P[r|s] = \frac{P[s|r]\cdot P[r]}{P[s]} \quad (11.12)$$

$$P[s]P[r|s] = P[s|r] \cdot P[r] = P[r,s] \quad (11.13),$$

где $P[r,s]$ *– объединенная вероятность*

Объединенная вероятность показывает вероятность того, что мы одновременно наблюдали или не наблюдали два связанных события - выброс медиатора при наличии спайка или отсутствие выброса при покое.

Подставим значения из формул 90-91 в 89 и получим более компактную запись:

$$I_m = -\sum_{r,s} P[r,s]log_2 \frac{P[r,s]}{P[s]P[r]} \quad (11.14)$$

Исходя из расчетов, можем построить графики доли переданной информации между пресинаптическим и постсинаптическим нейронами (B) и график переданной информации, деленной на затраты энергии (C) для моносинаптического нейрона (рис. 11.9).

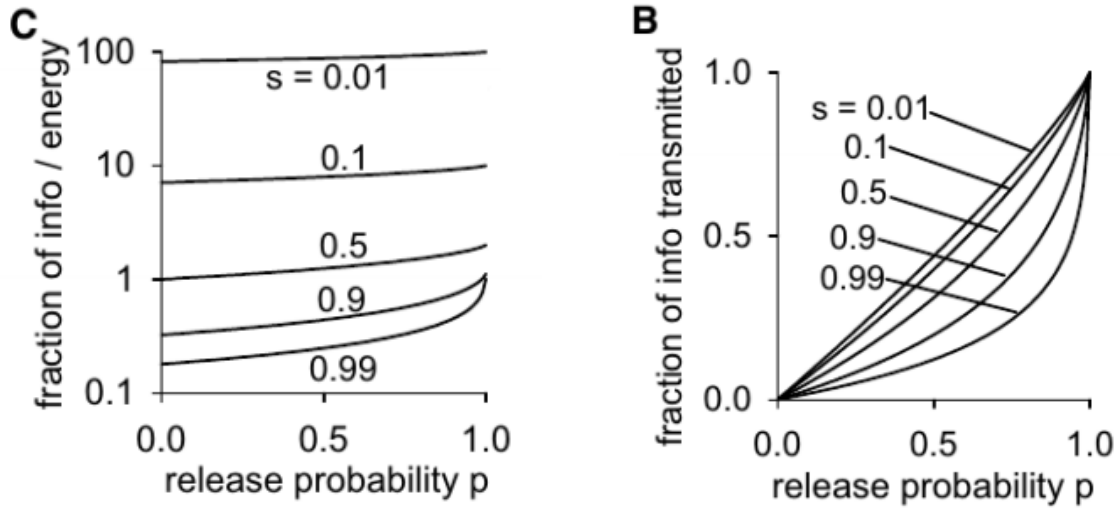


Рисунок 35. Графики для моносинаптической связи

Получается, что чем больше вероятность выбросить медиатор, тем естественно больше будет доля переданной информации. Зависимость будет максимально линейной при минимальной вероятности генерации потенциала действия. Если посмотреть на затраты энергии, то можно увидеть, что чем меньше частота генерации ПД, тем более оптимальна передача энергии.

В случае полисинаптической связи (рис. 11.10), можно увидеть, что доля переданной информации, в зависимости от вероятности выбросить медиатор нарастает в зависимости от количества синапсов. Доля переданной информации будет падать при

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

увеличении количества синапсов, и нарастает при уменьшении вероятности выбросить медиатор.

При учете спонтанного выброса (красные кривые), можно увидеть, что графики имеют оптимум.

На основании этих данных, можно построить график оптимальной вероятности выброса везикулы при высоких частотах генерации (рис. 11.11). По нему видно, что вплоть до высоких частот оптимальная вероятность ответа составляет примерно 0,2.

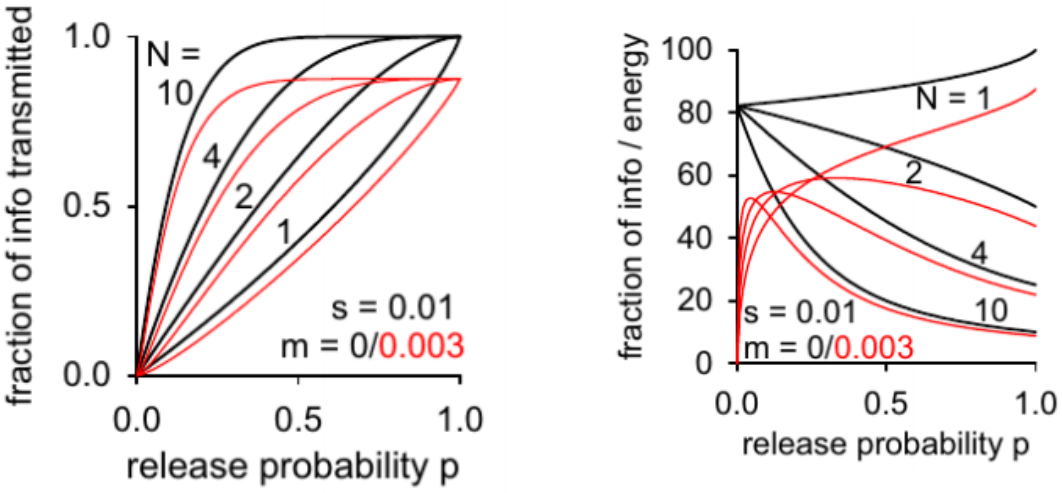


Рисунок 36. Графики для полисинаптической связи

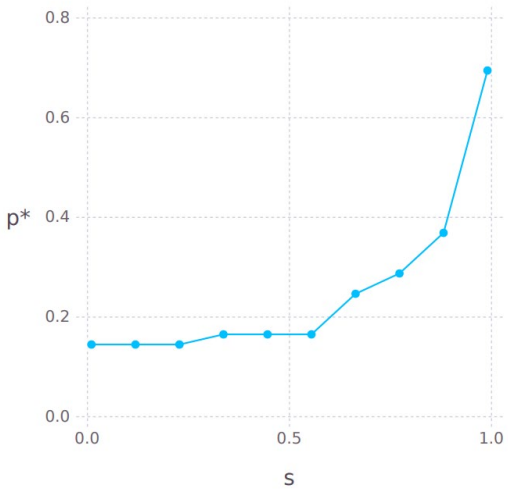


Рисунок 37. График оптимальной вероятности срабатывания синапса при высоких частотах

Размеры синаптических бутонов продиктованы временной шкалой, на которой они работают: за 1мс мы должны убирать глутамат из синаптической щели, поэтому в диаметре они составляют примерно 1 микрон. В захвате глутамата также принимают участи отростки астроцитов.

Оптимизация затрат АТФ на уровне постсинаптической мембраны

Оптимальное количество рецепторов:

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

По формуле 81 мы знаем, что ток равен произведению проводимости на изменение мембранного потенциала. Суммарная проводимость всех рецепторов равна:

$$G_{syn} = gpk \quad (11.12)$$

где g – проводимость одиночного канала, p – вероятность найти канал в открытом состоянии,
k – число каналов

Соответственно, в состоянии покоя:

$$G_{rp} = \frac{1}{R_{in}} \quad (11.13),$$

где R_{in} – входное сопротивление канала

Отсюда можно выразить разность потенциалов, возникающую при открывании каналов:

$$\Delta V = \frac{G_{syn}(V_{syn} - V_{rp})}{G_{syn} + G_{rp}} = \frac{V_{syn} - V_{rp}}{1 + \frac{G_{rp}}{G_{syn}}} \quad (11.14)$$

Тогда выразим К – минимальное количество рецепторов, необходимое для генерации ПД:

$$K = \frac{\Delta V}{pgR_{in}(V_{syn} - V_{rp} - \Delta V)} \quad (11.15)$$

Отсюда видно, что чем больше входное сопротивление, тем меньше нужно задействовать рецепторов. Для увеличения своего входного сопротивления, клетка может уменьшить суммарное количество каналов. Так, в целом, и происходит в мозге – самые быстрые нейроны, гранулярные клетки мозжечка, очень маленькие, за счет чего имеют большое входное сопротивление и для их активации требуется задействовать всего несколько каналов. Можно посмотреть на зависимость смещения потенциала от числа AMPA-рецепторов (рис. 11.12).

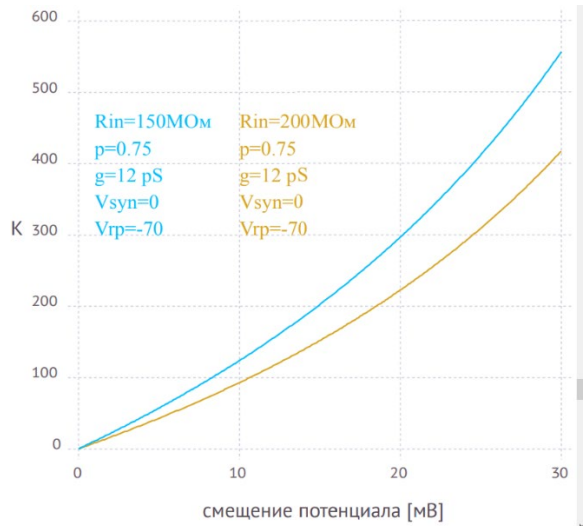


Рисунок 38. Зависимость смещения потенциала от числа AMPA-рецепторов

С одной стороны, нам выгодно иметь высокое входное сопротивление, т.к. тогда мы тратим меньше энергии по поддержание потенциала покоя. С другой стороны, чем выше

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

входное сопротивление, тем медленнее τ, а значит меньше рабочая частота и в то же время начинает сильнее влиять шум одиночных каналов (ведь открывание канала – процесс стохастический).

Флуктуацию тока через одиночный канал можно назвать дисперсией тока. Дисперсия величины есть:

$\sigma^2 = \frac{1}{N}\sum(x - \bar{x})^2$ (11.16)

Формулу 97 можно рассмотреть, как разность квадратов:

$\sigma^2 = \frac{1}{N}\sum(x^2 - \bar{x}^2 - 2x\bar{x})$ (11.17)

Теперь мы можем вынеси за знак суммы $\bar{x}^2$:

$\sigma^2 = \bar{x}^2 + \frac{1}{N}\sum x^2 - 2\bar{x}\frac{1}{N}\sum x$ (11.18)

Заметим, что $\frac{1}{N}\sum x = \bar{x}$ и $\frac{1}{N}\sum x^2 = < x^2 >$ - среднему значению от x^2. Тогда:

$\sigma^2 = < x^2 > - < x >^2$ (11.19)

Если мы рассмотрим микроскопически флуктуации тока одиночного рецептора, то средний ток:

$< i > = ip$ (11.20)

Средний квадрат тока будет:

$< i^2 > = i^2 p$ (11.21)

После подстановки получим дисперсию флуктуации тока:

$\sigma^2 = i^2 p - i^2 p^2 = i^2 p(1 - p)$ (11.22)

Чтобы получить дисперсию по ансамблю каналов, нужно умножить выражение 103 на количество каналов k. Из полученной формулы есть два следствия:

1. Если $p \ll 1$, то членом $i^2 p^2$ в уравнении 103 можно пренебречь
2. Может выразить соотношение сигнал/шум:

$$SNR = \frac{\text{M}}{\sigma} = \frac{kip}{\sqrt{ki^2 p(1-p)}} = \sqrt{\frac{kp}{1-p}} \quad (11.23)$$

Теперь мы можем померить соотношение сигнал/шум деленое на энергозатраты. Чем меньше рецепторов на синапс, тем более оптимально это соотношение, но очень небольшого количества нам может не хватить (рис. 11.13). Тогда оптимум будет считаться при учете уменьшения количества каналов при сохранении возможности проведения потенциала.

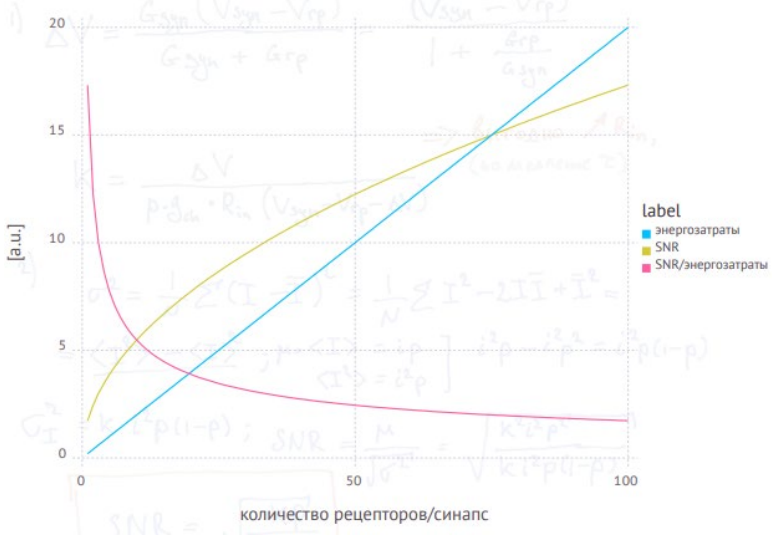


Рисунок 39.

Объединим полученные выводы:

- Размер синаптического бутона (~1μ) продиктован временной шкалой (~1мс)
- Количество рецепторов на постсинаптическую мембрану ограничено плотностью и затратами энергии
- Низкая афинность AMPA-рецепторов к глутамату определяется необходимостью быстро диссоциировать при временной шкале 1 мс
- NMDA-рецепторы открываются на большее время, при этом пропускают кальция и блокируются ионами магния

AMPA- и NMDA-рецепторы гомологичны между собой и в процессе эмбрионального развития встречаются AMPA-рецепторы, которые проводят кальций. Но в последствии, молекулы мРНК будущих AMPA-рецепторов проходят редактирование и отрицательных зарядов в селективном фильтре становится меньше. Таким же образом, например, при помощи сайт-направленного мутагенеза можно сделать рецепторы, проводящие анионы, если заменить отрицательно заряженные остатки в селективном фильтре на положительные.

Однако, в коре есть нейроны, которые должны работать при больших частотах для быстрой обработки сенсорной информации. Для нормальной работы слуха необходимо воспринимать частоты до нескольких кГц и для этого нужны нейроны способные генерировать ПД с частотой до нескольких кГЦ. На это способны слуховые волокна и нейроны вентрального кохлеарного ганглия, обрабатывающие эту информацию.

Эти быстрые нейроны называются «октопусные» или octopus cells. Их входное сопротивление радикально меньше, чем у остальных нейронов, для быстрой обработки постсинаптических токов. При сопротивлении 5 Мом они потребляют примерно $1.5*10^{10}$ АТФ/нейрон в секунду только на поддержание потенциала покоя.

Их входное сопротивление такое низкое за счет наличия калиевых токов g_{KL}, которые активируются при достаточно низких потенциалах и токов активирующейся

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

гиперполяризации. Кроме того, они имеют быстрые изоформы AMPA-рецепторов, которые также способны проводить кальция. Но все рано этим клеткам не хватает одиночных синаптических токов. Для складывания потенциалов на этих клетках конвергируют сотни синапсов, которые активируются в узком окне времени, т.к. при расхождении по времени они будут неспособны сложиться в фазе, и клетка не сгенерирует потенциал на своем аксоне. Фактически, эти клетки являются детекторами совпадения звуков на разной частоте.

Кроме того, существует проблема, обусловленная особенностью улитки – волокна улитки, чувствительные к высоким частотам, активируются раньше. Таким образом в слуховых волокнах, которые конвергируют на octopus cells есть задержка, вызванная связанная с функциональной особенностью улитки. В таком случае возникает вопрос, как сложить узкие синаптические входы таким образом, чтобы они смогли прийти на сому одновременно. Клетка решает эту проблему следующим образом. Она размещает слуховые волокна таким образом, что те, которые кодируют высокие частоты, приходят на самые дальние кончики его дендритного дерева, а те, которые кодирую низкие частоты, имеющие задержку по времени, расположены максимально близко к соме (рис. 11.14).

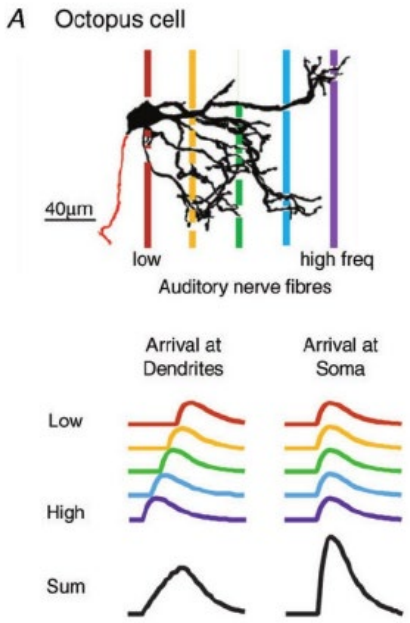


Рисунок 40. Дендритное дерево "октопусной" клетки

Еще одна особенность этих клеток в том, что их порог – не смещение мембранного потенциала, а скорость деполяризации. Кроме того, его ПД небольшие и не имеют овершута, что связано с высокой проводимостью по калию.

Резюме:

- Наш мозг потребляет довольно много энергии, причем во время активности может увеличить потребление только на ~30%

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

- У крысы около 50% фонового потребления энергии тратится на обеспечение ВПСП
- У человека баланс не сходится с наблюдаемым потреблением при 9 ПД/с
- Синапсы (большинство) оптимизованы под обработку событий с характерным временем ~ 1 мс
    - Размеры синаптических бутонов (~1 мкм) определяются временем диффузии глутамата (~1 мс)
    - AMPA-рецепторы имеют низкую афинность к глутамату, чтобы успевать диссоциировать за времена ~1 мс
    - И их должны быть около 100 на синапс для обеспечения SNR
- Если один аксон дает несколько контактов с целевым нейроном, оптимальной по энергозатратам будет низкая вероятность выброса везикулы с нейромедиатором. Следует учитывать энергоэффективность при теоретическом рассмотрении механизмов кодирования информации нейроном или их ансамблями

Оптогенетика

Существую светочувствительные каналы, которые при активации светом определенной длинны волны начинают проводить катионы или анионы в клетку (рис. 11.15). При доставке этих рецепторов в некоторые типы нейронов или астроцитов мы получим возможность воздействовать при помощи световода на субпопуляцию нейронов.

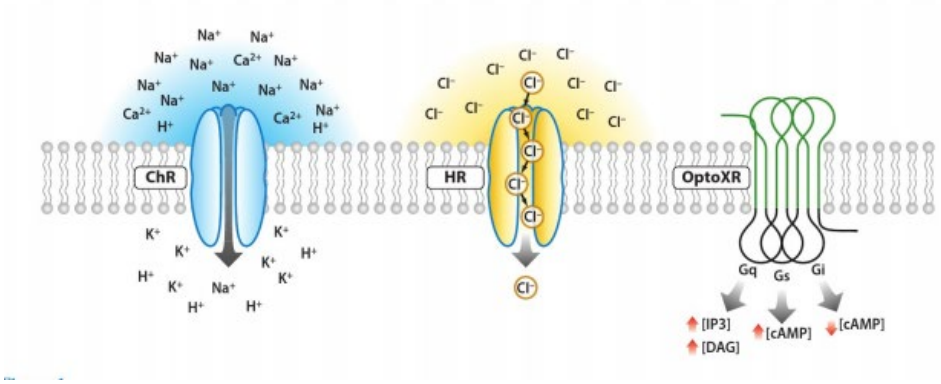


Рисунок 41. Различные виды светочувствительных рецепторов и их принцип работы

Этот метод позволяет классифицировать нейроны по синтезируемым в них белкам.

Связь физико-химических свойств мембраны с потенциалом действия нейрона

Если определить теплопродукцию аксона во время проведения, то можно увидеть, что этот процесс на определенных фазах может быть эндотермическим или экзотермическим – т.е. суммарно он сначала выделяет, а потом поглощает энергию из окружающей среды (рис. 11.16).

Кроме этого, можно измерять светоотражение от мембраны, и увидеть изменение рассеяния света на мембране в соответствии с генерацией отдельных потенциалов действия (рис. 11.17).

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

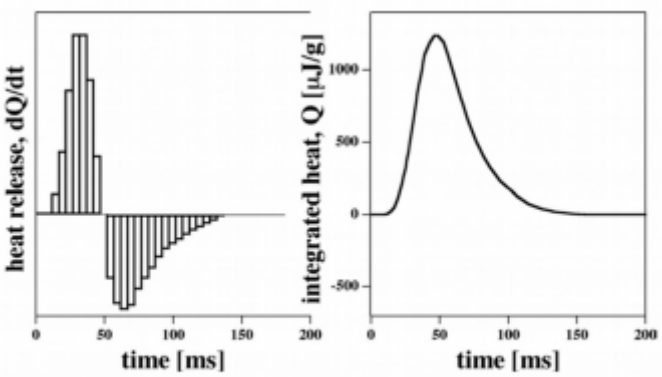


Fig. 18.5 Heat release in garfish olfactory nerve. Left: During the action potential one finds an initial phase of heat release that is followed by a phase of heat absorption. Right: Integration of the rate of heat release reveals that within error no net heat is released. Data adapted from Ritchie and Keynes (1985).

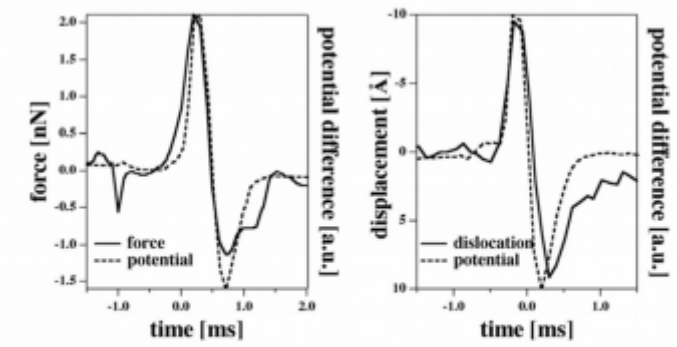


Fig. 18.7 Mechanical changes during the action potential. Left: Force on a piston during the action potential in a squid axon. The solid line represents the voltage changes and the dotted curve the force. Right: During the nerve pulse in a squid axon the thickness of the nerve changes proportional to the voltage. Data adapted from Iwasa and Tasaki (1980).

Рисунок 42. Теплопродукция нейрона

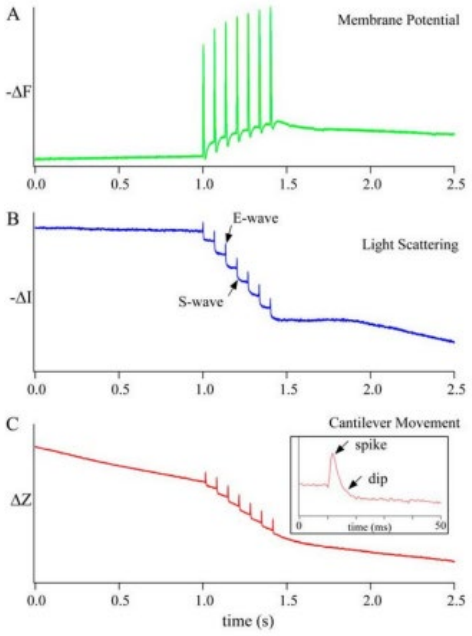


Рисунок 43. Изменение рассеяния света при проведении ПД

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

При помощи атомно-силовой микроскопии можно увидеть механические изменения толщины нервного волокна. Есть разные теории объясняющие причины этого процесса. Одна из них заключается в том, что белки, находясь в разной конформации имеют разную протяженность гидрофобных групп. Это приводит к перестройке липидов в мембране и происходят механические изменения (рис. 11.18).

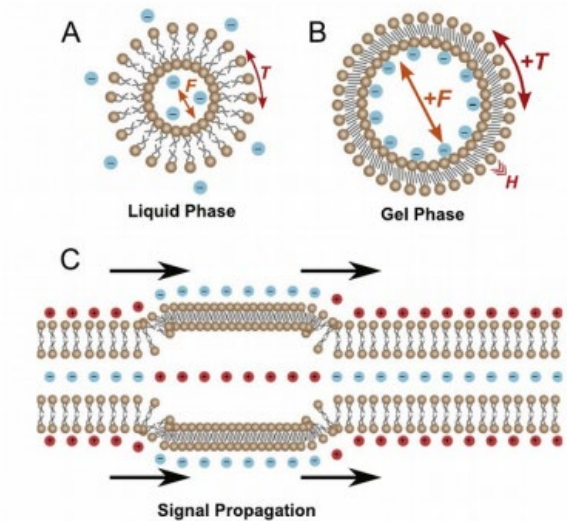


Рисунок 44. Изменение толщины аксона во время проведения ПД

Лекция 8

Внутримолекулярная динамика белка. Гемоглобин.

Гемоглобин – белок, представляющий из себя тетрамер (рис. 12.1).

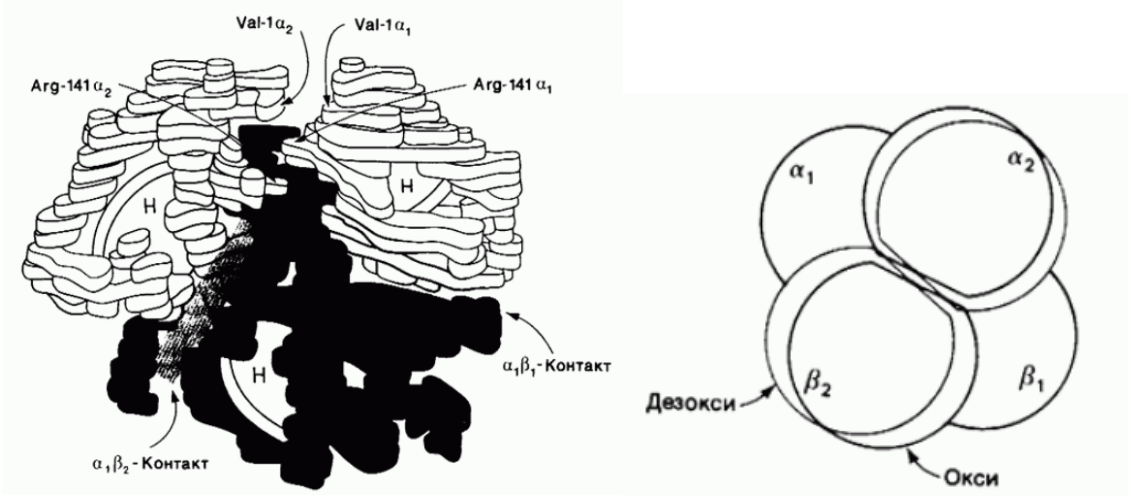


Рисунок 12.1. Структура белка гемоглобина

Железо гемоглобина немного выходит из плоскости гема на небольшое расстояние (рис. 12.2). При присоединении кислорода, железо, не меняя валентности, меняет свое спиновое состояние. При этом Fe сдвигается в плоскость гема и запускаются масштабные конформационные изменения субъединиц железа, влияющие на активность последующей оксигенации соседних субъединиц. Таким образов, в молекуле гемоглобина наблюдается кооперативный эффект.

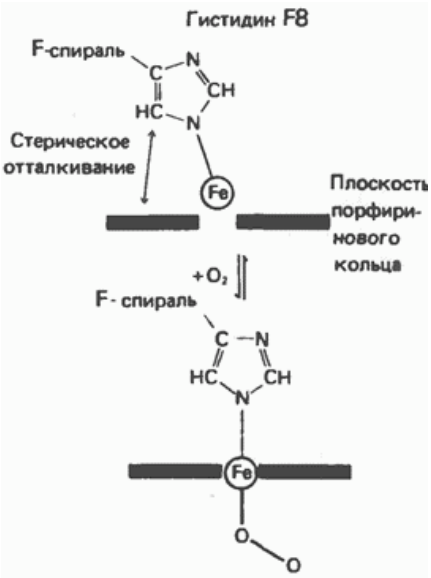


Рисунок 12.2. Присоединение кислорода к атому железа в молекуле гемоглобина

При уменьшении количества неоксигенированных субъединиц изменяется энергия активации:

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

$$\Delta E = \Delta E_n - N\varepsilon \qquad (12.1)$$

где N – количество оксигенированных субъединиц,

ε – константа пропорциональности

Можно провести аналогию с четырьмя карточками, соединенными вместе (рис. 12.3). При этом, при попытке разделить эти карточки, каждая последующая будет отрываться с меньшим усилием.

Рисунок 12.3. Пояснение хода оксигенации гемоглобина на примере почтовых марок.

Теперь посмотрим, как сдвиг атома железа и последующие конформационные изменения влияют на движущую силу процесса. Рассмотрим кривые потенциальной энергии двухатомной молекулы (рис. 12.4). Таким образом На расстоянии R_0 достигается равновесная конфигурация.

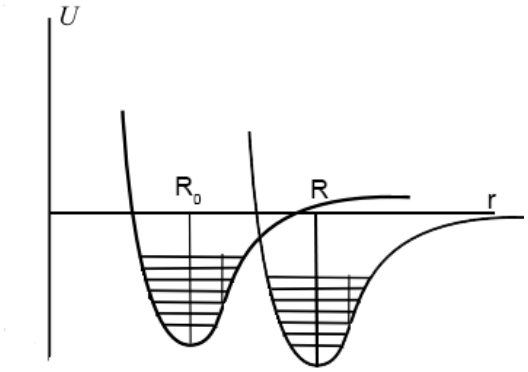


Рисунок 12.4. Кривые потенциальной энергии двухатомной молекулы

Энергия активации, в классической интерпретации, это энергетический барьер. Идея о том, что энергетические изменения происходит за счет взаимодействия частей одной и той же молекулы сейчас общепризнана.

Динамику белков изучают с помощью различных меток. В белок вводится метка, по движению которой можно оценить характер внутримолекулярных движений. Также мы можем обнаружить ближайшие к этой метке пустоты. Можно также оценить за какое время в среднем может произойти поворот на угол, допустим, π/2. Если это время маленькое, то, соответственно, подвижность большая.

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

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

Рассмотрим методы изучения внутримолекулярной подвижности в белке:

Люминесцентные метки

При поглощении кванта света, по принципу Франка-Кондона, происходит переход на верхний уровень, молекула переходит в возбужденное состояние. При этом вершины этих парабол сдвинуты. Ядро не успевает сместиться и дальше молекула находится в термально возбужденном состоянии. Ядра отклонены от положения равновесия. Колебательная релаксация происходит за время существования электронного возбужденного состояния, которое для ароматических соединений составляет в среднем 10^{-9}-10^{-8} с. За время порядка наносекунд молекула переходит в основное состояние с испусканием кванта света. Дальше, с колебательных подуровней основного состояния электрон может снова опуститься на нижний подуровень, диссипируя энергию в тепло. Из графика видно, что квант флуоресценции имеет меньшую энергию, чем возбужденный квант.

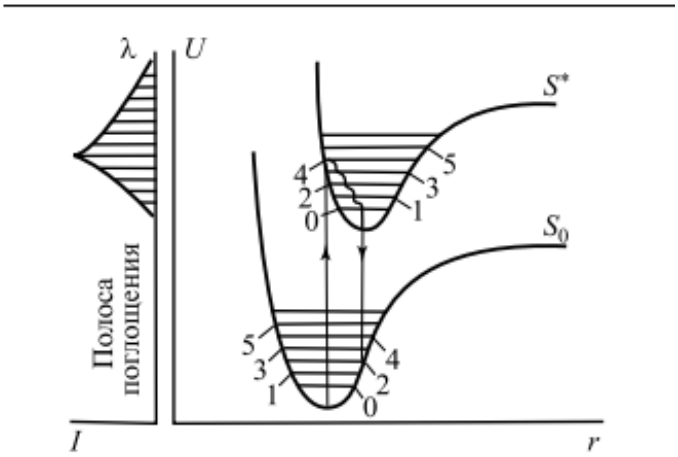


Рисунок 12.5. Схема перехода между энергетическими уровнями во флуоресцирующей молекуле при поглощении и излучении кванта

В растворе всегда получается так, что длинна волны флуоресценции всегда больше, чем длинна волны поглощенного света. При диссипации избытка колебательной энергии она переходит в окружение метки – на молекулы растворителя, и эта энергия переходит в тепло.

В белке же несколько иначе. Если взять тирозин и измерить максимум спектров его флуоресценции в зависимости от температуры, то при комнатной температуре он будет около 345 нм. Если мы возьмем тирозин в растворе и будем понижать температуру, то максимум будет смешаться слабо и сам спектр будет уже. Это связано с тем, что при комнатной температуре заселенность подуровней более равномерная, чем на холоде, когда наиболее заселены нижние подуровни. Если проводить этот опыт в нативном белке с водой, то максимум флуоресценции сдвигается с 345нм до 300 нм – в коротковолновую сторону. (рис. 12.6). Это происходит потому, что внутремолекулярные движения в белке замедленны и время релаксации увеличивается и становится больше, чем время жизни

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

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

возбужденного состояния. По этой причине электрон начинает спускаться с верхних колебательных подуровней, и энергия флуоресцирующего кванта увеличивается.

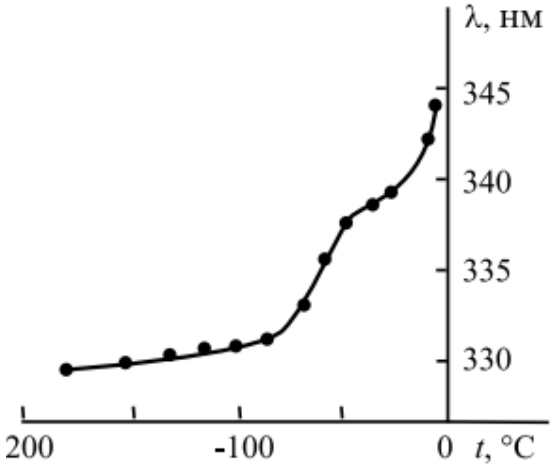


Рисунок 12.6. Зависимость положения максимума флуоресценции нейротоксина 2 кобры от температуры при pH 6,5

Вода, как полярный растворитель, достаточно подвижна и она присутствует в белке. Во время поглощения света у нас образуется диполь, который вызывает ориентацию диполей воды. Раз произошла ориентация, энергия диполя понижается, пока он находится в возбужденном состоянии и, соответственно, длинна волны света увеличивается – происходит сдвиг максимума флуоресценции. Этот процесс зависит от температуры, т.к. она влияет на подвижность диполей растворителя.

По сдвигу максимума флуоресценции в зависимости от температуры мы можем найти время релаксации. Время релаксации можно использовать для оценки внутримолекулярной подвижности окружения метки.

При использовании фосфоресцентных меток, меняется время релаксации, т.к. в триплетном состоянии электрон может находиться намного дольше из-за того, что для данного перехода требуется переориентация спина, что делает этот переход маловероятным. (рис. 12.7). Время жизни триплетного состояния находится между миллисекундой и микросекундой. Это позволяет нам проводить замеры с большими временами.

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

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

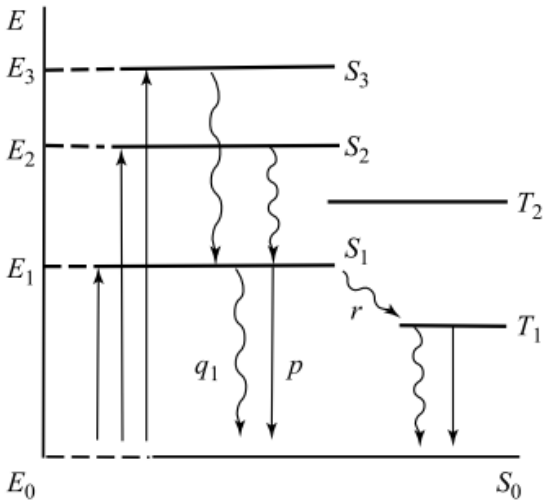


Рисунок 12.7. Электронные уровни органической молекулы.

Метод электронного парамагнитного резонанса.

Суть метода в том, что в постоянном магнитном поле спины электронов будут ориентироваться вдоль поля. При этом энергетический уровень электрона будет расщепляться на два уровня, в соответствии с параллельным и антипараллельным действующему полю направлением спина (рис. 12.8).

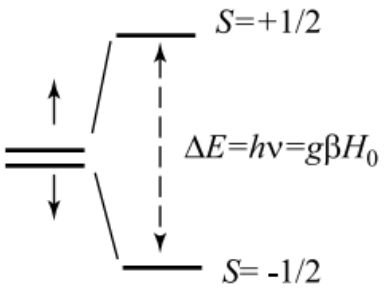


Рисунок 12.8. Расщепление энергетических уровней электрона в постоянном магнитном поле

При воздействии переменного поля будут происходить вынужденные переходы между уровнями с одинаковой вероятностью. Т.к. заселенность нижнего уровня, в соответствии с распределением Больцмана, выше, то будет происходить резонансное поглощение энергии переменного поля.

Однако, получаемые пики будут достаточно размыты (рис. 12.9). Это происходит потому, что вследствие процессов релаксации, состояние спина имеет определенное время жизни, что вызывает уширение резонансного сигнала из-за соотношения неопределенности для энергии. Это соотношение означает, что ширина уровня какой-то системы связано с временем существования системы соотношением неопределенностей:

$\Gamma T \sim \hbar$ (12.2)

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

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

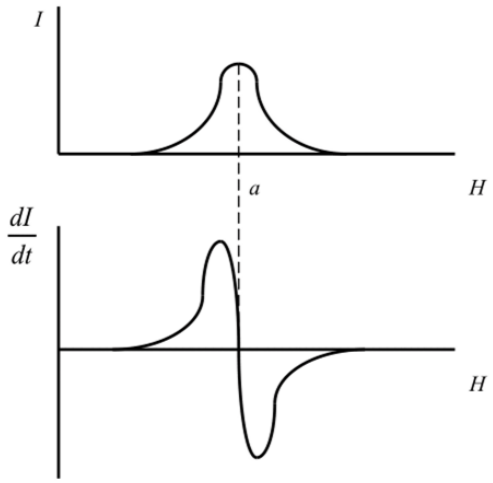


Рисунок 12.9. График резонансного поглощения и его первая производная

Отличие соотношения неопределенностей для энергии от неопределенности Гейзенберга в том, что одинаково точных координат и импульса для частицы не существует, а в нашем соотношении мы просто не можем его точно определить.

Можно провести аналогию. Допустим, мы измеряем при помощи теодолита высоту стола по положению шарика. Высота стола известна. Если шарик не двигается, то мы можем спокойно произвести измерения. Но в случае, если поверхность стола скользкая (уменьшается время жизни) будет постоянно возникать погрешность в измерениях, т.к. мы не будем успевать навестить на шарик. И возникающие погрешности будут тем больше, чем меньше время нахождения шарика в состоянии покоя.

Если вы вводим метку нитроксильного радикала, то он находится в окружении, содержащем магнитные неоднородности. Эти неоднородности могут влиять на наш радикал складываясь (или вычитаясь) с магнитным полем. Поэтому, фактический резонанс наблюдается не в точном положении. Эти поля могут вызывать дополнительную размытость на спектре ЭПР. В случае, если метка начинает быстро двигаться, она может усреднить эти влияния.

По аналогии, нашу метку, на которую влияют магнитные неоднородности, можем представить в виде птицы, которая кушает из разных кормушек. Получается, каждая кормушка вносит свой вклад в состав пищи птицы. Тогда при условии, что еда не перемешивается в ЖКТ птицы, а двигается по нему последовательно, мы можем получить некий спектр его питания. На оси абсцисс отложим условный номер кормушки, а по оси ординат – съеденный вес пищи. Тогда площадь под этой кривой будет отражать суммарное количество съеденной еды. Ширина полученного спектра будет характеризовать разброс.

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

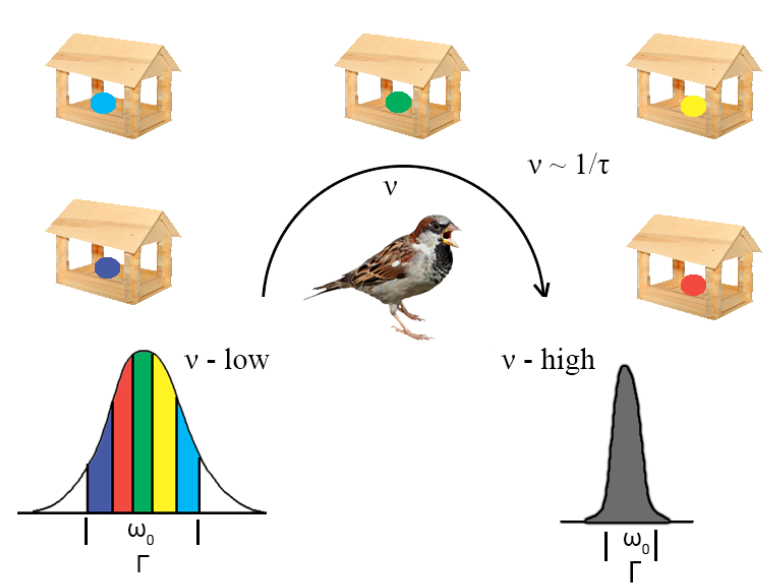


Рисунок 12.10. Иллюстрация к аналогии с птицей для объяснения усреднения влияния окружения спиновой меткой

В случае, если птица начнет летать быстро между кормушками, она будет не успевать проглатывать еду, и она будет перемешиваться в ее зобе – таким образом она усредняет потребленную пищу. Это возможно если время перелета птицы меньше, чем время проглатывания пищи. В таком случае, вес еды будет представлен в виде столбика, а разброс по оси абсцисс будет отсутствовать – линия резонанса будет узкая.

Таким образом, как мы выяснили, усреднение влияний окружения будет зависеть от подвижности зонда, которая зависит от наличия свободного пространства. Формула зависимости будет выглядеть таким образом:

$$\Gamma = \Delta H \sim \frac{1}{T_{exper}} \sim \frac{1}{2T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (12.3)$$

где T_2 – время спин-спиновой релаксации,

T_1 – время спин-решеточной релаксации

Для свободных радикалов $T_1 \gg T_2$.

Время спин-спиновой релаксации T_2 пропорциональна:

$$T_2 \sim \frac{1}{H_{loc}} \sim \frac{1}{\Delta\omega} \sim \nu \sim \frac{1}{\tau_c} \quad (12.4)$$

Метод спиновых меток заключается в присоединении к какой-либо функциональной группе белка свободного радикала и изучения его спектров ЭПР. Наиболее удобны в этом отношении нитроксильные радикалы.

Азот нитроксильного радикала в составе метки создает магнитное моле, складывающееся с внешним магнитным полем (рис. 12.11). Таким образом, мы можем наблюдать расщепление поглощения сигнала ЭПР (СТС) (рис. 12.12).

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

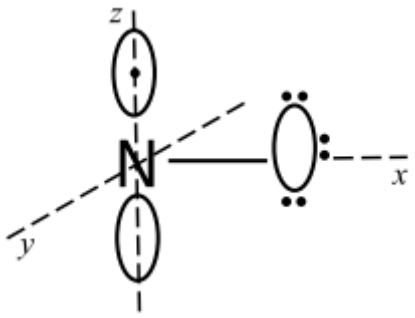


Рисунок 12.11. Схема парамагнитного фрагмента нитроксильного радикала

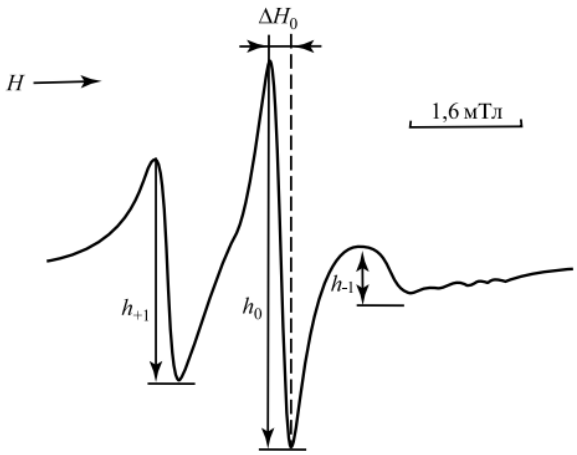


Рисунок 12.12. Спектр ЭПР парамагнитной метки

Ширина линий спектра связана со временем внутримолекулярной подвижности по формуле:

$$\tau_c = 6{,}65\Delta H_{+1} \cdot 10^{-9}\left(\sqrt{h_{+1}/h_{-1}} - 1\right) \qquad (12.5)$$

Нанесение метки на разные зоны белка, может изменять τ_c на порядки. При этом, при нанесении метки на наружную зону белка, мы будем наблюдать три эквидистантные линии, а при ее нанесении на его внутренние зоны будет наблюдаться уширение линий на спектре (рис. 12.13).

Внутримолекулярные движения очень тесно связаны функциональной активностью белка. Так, при рассмотрении АТФсинтазы, на спектре ЭПР видно уширение, когда она находится в неактивном состоянии.

Этот метод также можно использовать при анализе крови на наличие каких-либо веществ. Для этого берутся антитела к необходимому веществу и к ним добавляются меченные лиганды. При наличии в крови пациента искомого вещества, оно будет вытеснять меченный лигант, что отразится на спектре (полосы на спектре сузятся).

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

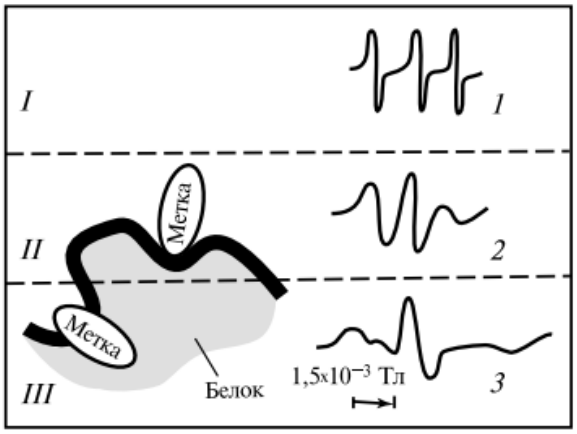


Рисунок 12.13. Подвижность различных слоев водно-белковой матрицы

Ядерный магнитный резонанс

Некоторые ядра, например основные изотопы C и O, имеют отличные от нуля значения спина I и магнитного дипольного момента. При этом магнитные моменты разных ядер отличаются друг от друга. Внешнее постоянное магнитное поле приводит к ориентации этих моментов и в случае спина I=1/2 приводит к расщеплению исходного уровня на два подуровня (рис. 12.14).

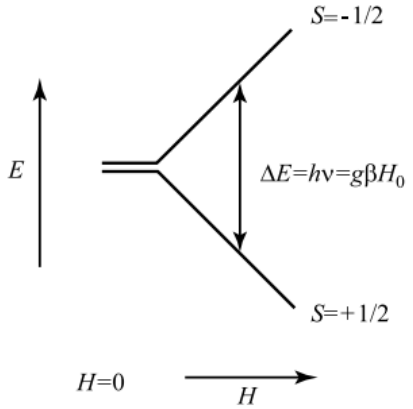


Рисунок 12.14. Расщепление энергетических уровней ядра

Кроме того, ядра влияют друг на друга через химические связи. При этом, индуцируются круговые токи, направление которых противоположно направлению вызвавшего их поля. При этом можно определить структуру белка. В случае ацетальдегида картина будет следующей (рис. 12.15).

Величина T_1 для протонов белка будет зависеть и от вращения белковой глобулы в целом, и от внутреннего движения. Температурная зависимость времени спин-решеточной релаксации обладает двумя минимумами, в то время как порошок белка только одним (рис. 12.16)

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

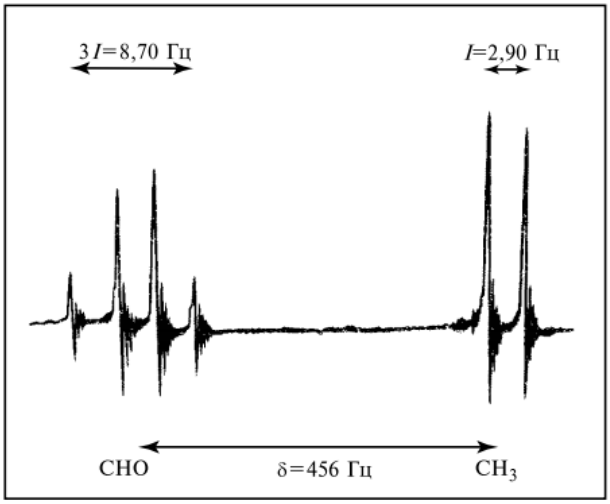


Рисунок 12.15. Спектр ЯМР ацетальдегида

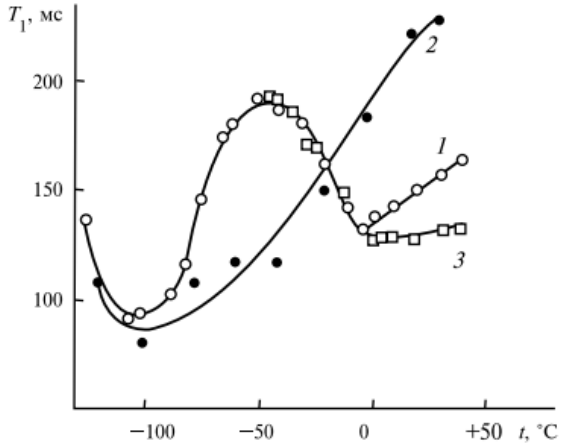


Рисунок 12.16. Температурная зависимость времени спин-решеточной релаксации протонов сывороточного альбумина человека.

Исследования показывают, что можно выделить три фракции воды:

1. Наружная, подвижная вода, имеющая большое T_2
2. Слабо связанная вода
3. Прочно связанная вода

Говоря о подвижности прочно связанной воды, нужно понимать, что она жестко зависит от подвижности белка.

Метод мессбауэровской спектроскопии или ядерного гамма-резонанса (ЯГР)

Данный метод позволяет определять амплитуды смещений атомов в структуре белка на коротких временах (10^{-7} – 10^{-9}). Он основан на том, что при поглощении γ-кванта ядро переходит из основного состояния в возбужденное. Данное поглощение наблюдается на ядрах тяжелых атомов, таких как железо. Величина кванта при этом составляет:

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

$\Delta E = E_2 - E_1 = 0{,}0144$ МэВ (12.6)

При этом, ширина уровня по соотношению неопределенностей для энергий примерно $\Gamma \sim 10^{-8}$ eV. На фоне такой маленькой ширине уровня можно найти смещение.

При поглощении кванта, часть энергии может перейти в поступательное движение ядра. Энергия отдачи определяется по формуле:

$E_{отд} = mv^2/2$ (12.7)

Из энергии отдачи можно рассчитать скорость и из нее узнать подвижность.

Ход эксперимента:

1. Берется образец и источник гамма-квантов
2. Источник начинает двигаться по отношению к образцу со скоростью 0,1-10 см/с
3. По эффекту доплера мы получаем разную частоту в зависимости от движения источника (рис. 12.17).

С ростом среднеквадратичного смещения $\langle x^2 \rangle$ мессбауэровского ядра вероятность поглощения кванта без отдачи f' падает. Она выражается формулой Дебая-Валлера:

$f' = \exp\left(-\frac{\langle x^2 \rangle}{\lambda'}\right)$ (12.8)

где $\lambda' = \lambda/(2\pi)$, λ – длинна волны гамма-кванта

Эффект Мессбауэра заключается в том, при понижении температуры движения будут замораживаться, и можно будет найти поглощение без отдачи. При этом, энергию отдачи берет на себя весь кристалл в целом и отдельные ядра не смещаются.

Рассмотрим график зависимости вероятности поглощения кванта без отдачи от температуры (рис. 12.18). Данная вероятность увеличивается при в

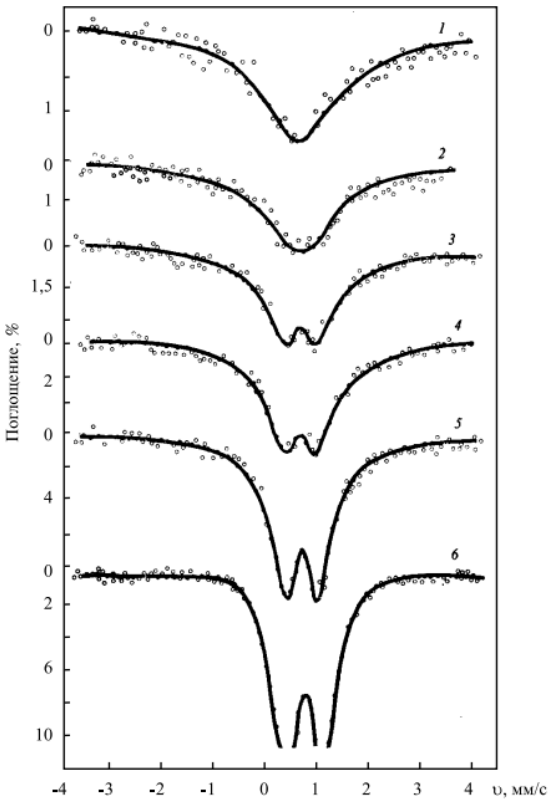


Рисунок 12.17. Мессбауэровкие спектры модифицированного сывороточного альбумина человека

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

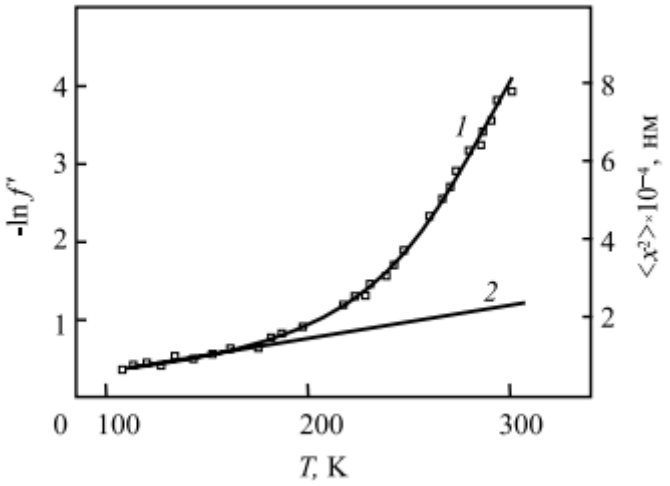


Рисунок 12.18 Температурная зависимость эффективного среднеквадратичного смещения ядер ^{57}Fe

Конформационная подвижность белков

Движение отдельных атомов белка совершается вокруг своего положения равновесия с амплитудой порядка $\leq 0{,}1$ Å. При этом, смещения в результате мессбауэровского взаимодействия порядка $0{,}5 \sim 1$ Å. При этом, можем представить два пространственных масштаба (рис. 12.19), где один масштаб — это движение вокруг положение равновесие, а другой – движение в вязкой среде.

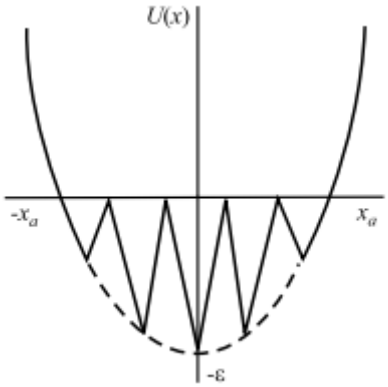


Рисунок 12.19. Конформационные движения в вязкой среде

Такое движение можно сравнить с движением шара в круглодонном сосуде. Если в этот сосуд добавить глицерина, то при движении колбы шарик не будет кататься по дну, а будет двигаться более неравномерно.

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

Белки	
Первичные события в фотосинтезе и зрении	$10^{-13}-10^{-12}$ с
Локальная динамика атомов и малых групп	$10^{-12}-10^{-11}$ с
боковых цепей и сегментов полипептидных цепей	$10^{-11}-10^{-7}$ с
Релаксация участков полипептидной цепи	$\sim 10^{-9}$ с
Движения доменов и субъединиц	$10^{-8}-10^{-5}$ с
Реакция переноса протона ионизируемых групп	$10^{-9}-10^{-7}$ с
Развертывание участков α-спирали	$10^{-8}-10^{-6}$ с
Высвобождение связанных молекул лигандов	$10^{-6}-10^{-3}$ с
Кинетика сворачивания-разворачивания	$10^{-4}-10^{2}$ с
Обмен прочно связанных ионов Ca	$10^{-3}-10^{-2}$ с
Нуклеиновые кислоты	
Колебания двойной спирали ДНК	$10^{-13}-10^{-11}$ с
Локальные движения основных пар	$10^{-10}-10^{-9}$ с
B-A переходы в ДНК	10^{-9} с
Кинетика интеркаляции	$10^{-4}-10^{-3}$ с
Распаривание пар оснований	$10^{-3}-10^{-1}$ с
Диссоциация и образование двойной спирали	$10^{-3}-10$ с
Биомембраны	
Релаксация фосфолипидных головок	$10^{-11}-10^{-9}$ с
Время транслокации ионов через каналы	$10^{-9}-10^{-8}$ с
Фазовые переходы в фосфолипидных бислоях	$10^{-2}-10^{-1}$ с
Флип-флоп переходы в липидах	10^{4} с
Вода	
Релаксация объемной воды	$10^{-12}-10^{-11}$ с
Релаксация гидратированных слоев	$10^{-11}-10^{-10}$ с
Времена жизни молекул связанной воды	$10^{-8}-10^{-2}$ с

Рисунок 12.20. Время протекания отдельных процессов

Рассмотрим скорости протекания процессов в клетке (рис. 12.20). События в активном центре также ограничиваются наносекундами. Времена различных функционально значимых событий в одной молекуле белка могут отличаться на 12-14 порядков.

Метод моделирования внутримолекулярной динамики

Зная, как первичная структура белка складывается во вторичную структуру, и зная все силы, действующие в белке, можем, при помощи компьютера, попытаться смоделировать его реальные движения. Равновесная структура, как известно находится в энергетическом минимуме. Этот минимум достаточно широкий, что позволяет белку совершать движения. Молекулярные группы, при этом связаны объемными взаимодействиями с соседями. Смещение белка происходит за счет случайных толчков растворителя, при этом молекулярные группы могут смещаться и изменяется ее взаимодействие с окружением. При моделировании мы можем задать эти случайные смещения случайным атомам, как это происходит в случае тепловых соударений.
Основу метода составляет численное решение классического уравнения Ньютона:

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

$$m_i \frac{d^2\overline{r}_i}{dt^2} = \overline{F}_i(\overline{r}), \quad (i = 1, \ldots, N) \qquad (12.9)$$

где F - суммарная сила, действующая на атом,
$\overline{r}_i$ *– радиус-вектор i-го атома,*
m_i *– масса i-го атома,*
N – число атомов

Суммарная сила рассчитывается как отрицательная производная потенциальной энергии U, зависящей от взаимного расположения всех атомов по величине смещения:

$$\overline{F}_i(\overline{r}) = -\frac{\partial U(\overline{r})}{\partial \overline{r}_i} \qquad (12.10)$$

где $U(\overline{r})$ – потенциальная энергия

Есть тонкий момент в том, что моделируемый весь ансамбль равновесный и в нем сохраняется распределение Максвелла по скоростям. Таким образом, при каждом смещении нам нужно, чтобы средняя температура сохранялась. Существует ряд способов избежать данную проблему.

С помощью данного метода можно найти траекторию движения. Среднеквадратичные смещения можно получить, производя последовательный пошаговый расчет новых координат, каждый раз усредняя температуру. Моделирование таким образом может проводиться до 10^{-6} секунд.

При помощи молекулярной динамики можно рассчитывать подвижность атомов на разных участках (рис.12.21).

Еще пример. При помощи данного можно провести сравнение вращения изолированного кольца тирозина, и этого же кольца в белке (рис. 12.22). В случае изолированных фрагментов наблюдаются почти гармонические колебания. Тогда как при моделировании в белке его динамика больше напоминает хаотический процесс.

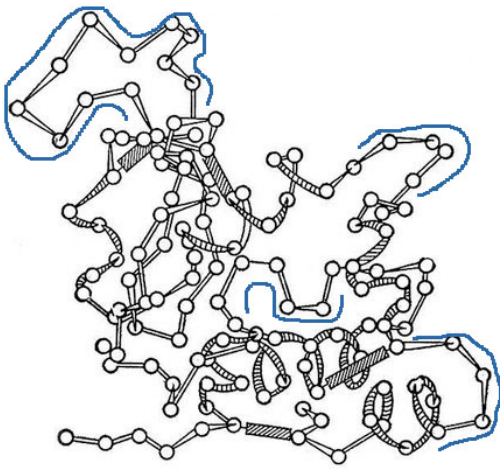


Рисунок 12.21. Структура молекулы лизоцима. Синим цветом отмечены подвижные участки

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

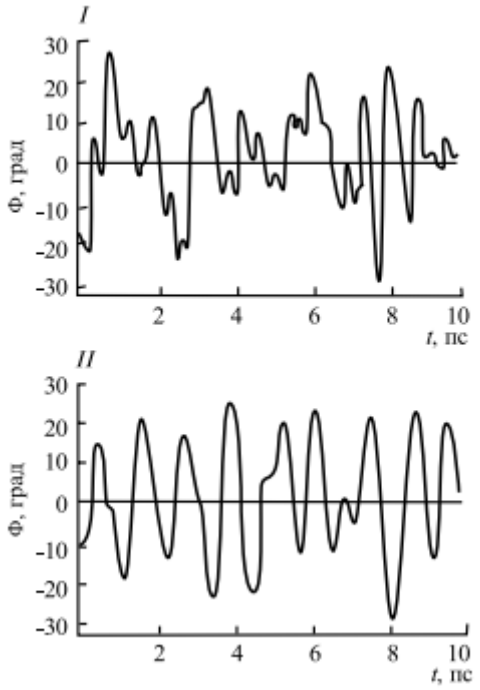


Рисунок 12.22. Изменение угла вращения кольца тир-21 (1) и изолированных тирозиновых фрагментов (2) при динамическом моделировании за время 9,8 пс

В качестве еще примера можем рассмотреть динамику к Ca^{+}-АТФазы с АТФ. Его кольцевые домены N и P движутся и раскрываются на какой-то угол. Также можно увидеть изменение этого угла во времени. В зависимости от того, работает ли система, получаются разные траектории.

Кроме этого, можно проследить докинг белков.

Молекула миоглобина, при связывании CO становится неактивна. Можно рассчитать при помощи молекулярной динамики, каким образом в белке будет совершать движения молекула угарного газа. Дается лазерная вспышка и CO отрывается. В этом случае он будет совершать движения внутри молекулы какое-то время, а после снова свяжется с железом. Это подтверждается на спектрах и при этом, при помощи молекулярной динамики можно посмотреть энергетику процесса на каждом этапе.

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

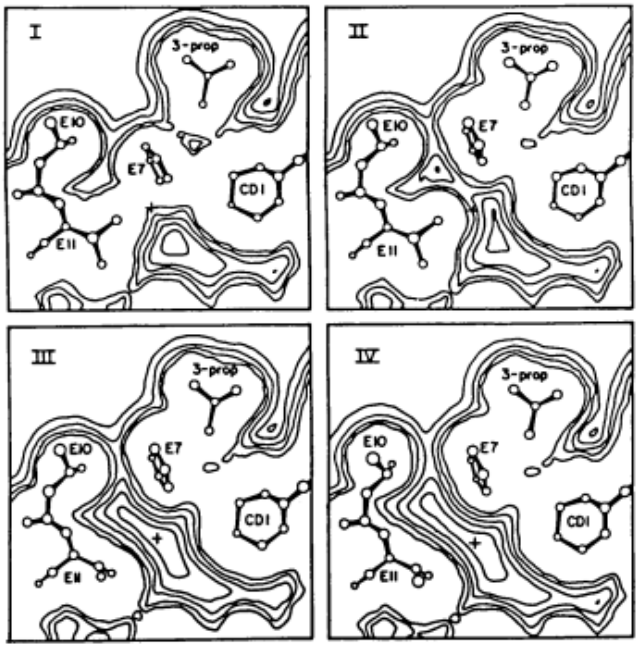


Рисунок 12.23. Контурная карта взаимодействия миоглобин-лиганд в плоскости

На этой карте железо (отмечено плюсом) постепенно оказывается в «энергетическом овраге», что снижает энергетический барьер его взаимодействия с CO.

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

Лекция 9

Механизм действия ферментов

Константа реакции зависит от энергии активации (рис.13.1). Фермент понижает энергию активации реакции. Наклон температурной кривой в координатах Аррениуса, соответственно, тоже меньше. Возрастает скорость реакции.

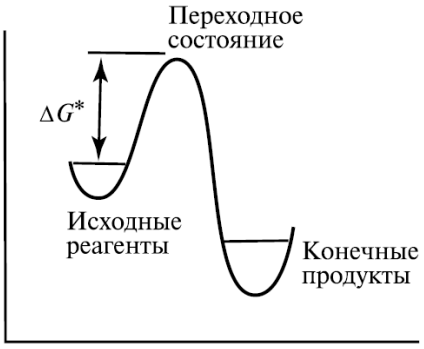


Рисунок 13.1. Изменение энергии реагентов вдоль координат реакции

Существует три классических теории (все модификации Аррениуса)

1) ключ-замок: чёткое соответствие субстрата и фермента (рис. 13.2)

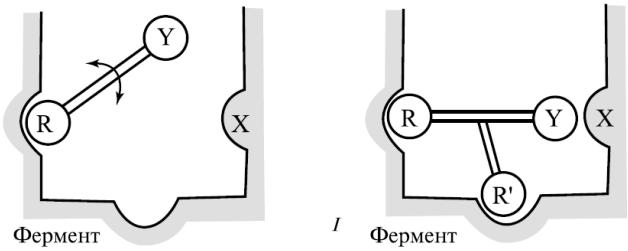


Рисунок 13.2. Эффект сближения субстрата и фермента

2) теория индуцированного соответствия (рука-перчатка) (рис. 13.3)

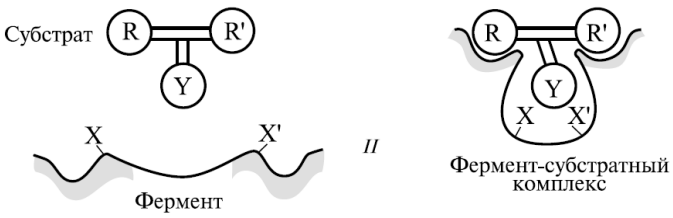


Рисунок 13.3. Эффект индуцированного соответствия

Суть: в процессе взаимодействия субстрата и фермента энергия сорбции не уходит в тепло, а сосредотачивается на связях, которые необходимо разорвать, происходит

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

переход в напряжённую конформацию (рис. 13.4), снижение энтропии, увеличение внутренней энергии -> понижение энергетического барьера

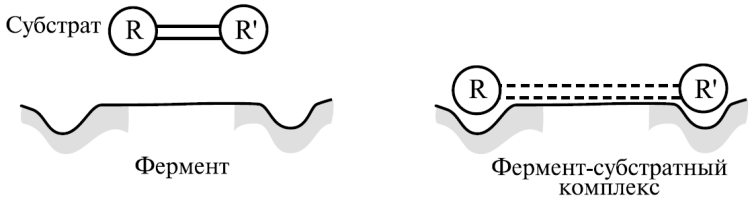


Рисунок 13.4. Механизм «напряжения»

3) Теория активированного комплекса:

$$\Delta G^* = \Delta H^{\#} - T\Delta S^{\#}$$

ΔH# - энтальпия активации, ΔS# - энтропия активации

Константа скорости – вероятность преодоления барьера, 10^{-12} это число попыток

Дельта U - энергия, которую нужно преодолеть

Суть теории: в активированном комплексе энтропийный член сам по себе не такой большой, то есть снижается замедляющий фактор.

Напряжённая конформация фермента должна держаться до прихода следующего субстрата. Возможно, здесь играет роль вся структура фермента. Доказательств существования этих конформационно напряжённых состояний нет.

Главное: энергия сорбции не расходуется в тепло.

Что говорит на эту тему современная биофизика:

При проникновении субстрата в АЦ, субстрат изменяет электронное состояние этого активного центра. Пример: гемоглобин, кислород, железо. Число соударений ни при чём. Важны внутримолекулярные движения.

Молекулярная динамика показывает: в белке открывается полость, в которую проникает фермент (каждую 10^{-6} с) и укладывается в продуктивную конформацию.

Этапы:

1. открытие пор
2. проникновение
3. изменение конформации субстрата и фермента
4. выход

Пример:

Хемотрипсин разрывает двойную пептидную связь следующим образом.

В активном центре фермента находятся гистидин с протоном и серин с кислородом, у которого есть не поделённая пара электронов. (см. рис. 13.5)

1) Неподеленные электроны кислорода переходят к углеродному атому
2) а электронная пара углерода выталкивается из пи-связи

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

3) Водородная связь His-Ser ослабевает
4) Протон притягивается к азоту субстрата

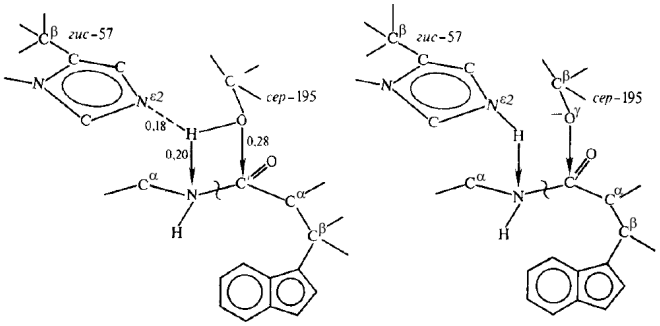


Рисунок 13.5. Расположение расщепляемой группы субстрата и боковых цепей сер-195 и гис-57 в невалентном комплексе α-хемотрипсина.

Итог: физхимия Аррениуса работает при подходе субстрата к ферменту, потом молекулярная динамика, потом, после установления продуктивной конформации – спонтанная реакция.

Перенос электронов

Вся биоэнергетика основана на разделении зарядов и потоке электронов в цепи. (фотосинтез, дыхание)

Раньше думали, что механизм похож на передвижение электронов в полупроводнике, но это не так, потому что организация белка далека от настоящей регулярной кристаллической решётки.

Будем считать, что если процесс не зависит от температуры, то это физический процесс, если зависит – химический. (Важно: на самом деле все процессы и физические, и химические одновременно. Разница между ними - условность). Эксперимент показал, что скорость переноса электрона в фотосинтетической цепи падает при снижении температуры (но не значительно), но даже при температуре 100 К (примерно температура жидкого азота) реакция идёт.

Между двумя переносчиками электронов (Cyt и пигмент) есть физический барьер. Перенос оказывается возможен даже при энергиях, недостаточных для преодоления этого барьера. Здесь имеет место туннельный эффект. Аналогов в классической физике ему нет. Эффективность реакции 100%, хотя, в теории, электрон должен совершать квантово-механические колебания и квантовый выход должен быть около 50%. Значит есть что-то, что препятствует возвращению электрона.

Для этого после перехода электрона должно произойти разрушение резонансного уровня за счёт ухода части электронной энергии по колебательным степеням свободы (релаксация).

Диаграмма (рис. 13.6) показывает эти переходы энергии при туннелировании. Eo – энергия активации, Er – энергия реорганизации среды, ΔE – тепловой эффект реакции

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

переноса электрона, ΔRo – смещение положения равновесия ядер при переходе системы из состояния *i* в состояние *f*.

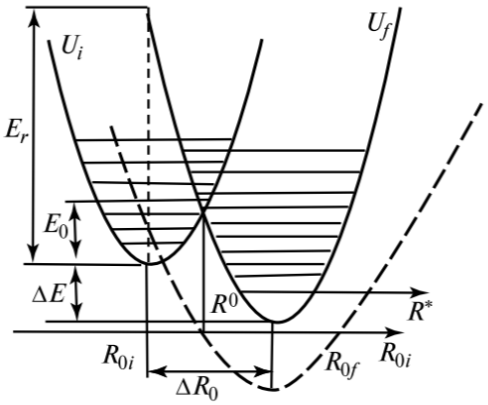


Рисунок 13.6. Электронно-колебательные взаимодействия при туннелировании электрона.

Необходимо, чтобы молекулы оказались в конфигурационных состояниях, близких к конечным.
Время перехода электрона – микросекунды,
Время релаксации – 10^{-12}
Наблюдаем мы электрон, когда уже вся система пришла в новое равновесное состояние, этот процесс занимает больше времени, поэтому все вычисляемые константы больше, чем предполагается из расчётов, связанных чисто с переходом и релаксацией.
Вероятность прохождения электрона через барьер – константа скорости. При увеличении температуры она растёт. При всех температурах квантовый переход вероятнее аррениусовского. Поэтому туннельный переход происходит всегда.
Механизм:

1) Донор отдаёт электрон (и Д, и А в соответствующих конформациях)
2) Акцептор принимает электрон, Д и А принимают равновесные конформации
3) Д и А прекращают взаимодействие в связи с новыми конформациями

В аналогии с лестницей потенциалов это можно представить этот механизм как поворот ступеньки для облегчения перехода.

Молекулярные моторы

Результат достигается за счёт взаимодействия отдельных частей макромолекулы.
Пример 1: АТФ-синтаза.
Механика: статор, ротор. Эксперимент с миозиновой нитью.
При повороте гамма-субъединицы меняется состояние активных центров β-субъединиц, синтезируется/выводится наружу ATP (см. рис. 13.7). Для соединения ADP и P у них должно быть высокое сродство к субъединице, а у ATP – низкое. Для обеспечения этого и вращается гамма-субъединица.

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

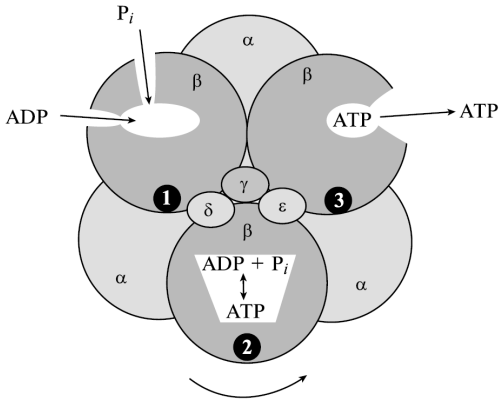


Рисунок 13.7. Схема, иллюстрирующая энергозависимые изменения состояний каталитических центров

Обеспечивает вращение следующее:
По полу-каналу протон из области с высоким pH подходит к Asp. Asp протонируется и делает «поворотик» и соответственно гамма-субъединица тоже проворачивается, при этом другой Asp оказывается у другого полу-канала, куда выходит протон (в область с низким pH). Asp приобретает отрицательный заряд и притягивается к Arg, что предотвращает дальнейшее вращение с-субъединиц.

Пример 2: движение кинезина по микротрубочкам.
«Ножки» кинезина болтаются за счёт тепловой энергии. Упорядоченность обеспечивается последовательными актами гидролиза ATP. Свободные ATP видны на ЭПР-спектрах, поэтому связанное состояние «ножки» можно регистрировать.

1) Одна ножка фиксирована (ATP), вторая свободна (ADP)
2) Гидролиз ATP, освобождение одной ножки и фиксация другой.

Бактериородопсин и родопсин
Движущая сила – переход ретиналя между цис- и транс- состояниями. В итоге выкачиваются протоны.

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

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

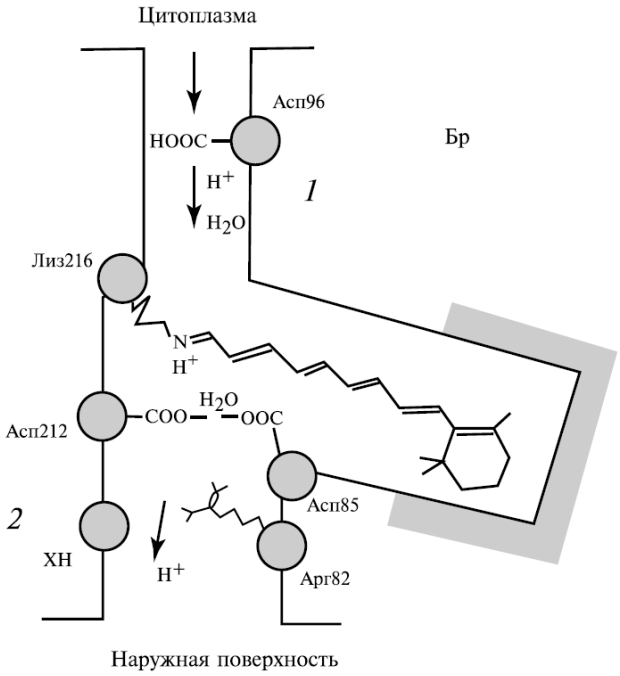


Рисунок 13.8. Схема переноса протона по цитоплазматическому (1) и периплазматическому (2) каналам

Тот же принцип работает в палочках сетчатки. Ретиналь родопсина переходит в цис-форму, каскад реакций поляризует мембрану, далее импульс передаётся по нервным клеткам.

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

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ