



ХИМИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ВВЕДЕНИЕ В СПЕЦИАЛЬНОСТЬ

ГЛАДИЛИН
АЛЕКСАНДР КИРИЛЛОВИЧ

ХИМФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

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



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
СТУДЕНТА ФИЛОСОФСКОГО ФАКУЛЬТЕТА МГУ
КУДБА ВЛАДИСЛАВА НОДАРИЕВИЧА



Содержание

Лекция 1. Введение.....	6
Базовый тест для проверки исходных знаний.....	6
Отличия живой и неживой природы.....	8
Углеводы.....	9
Классификация углеводов.....	10
Способы изображения моносахаридов.....	11
Лекция 2. Способы изображения моносахаридных молекул.....	13
D, L, R, S-проекции.....	13
Шестичленные молекулярные циклы.....	18
Пятичленные молекулярные циклы.....	21
Лекция 3. Методы углеводного синтеза.....	24
Метод Бутлерова-Лёва.....	24
Метод Килиани-Фишера.....	25
Деградация углеводов.....	26
Химические свойства углеводов: окисление.....	27
Химические свойства углеводов: восстановление.....	30
Химические свойства углеводов: перегруппировка.....	31
Химические свойства углеводов: дегидратация.....	32
Химические свойства углеводов: взаимодействие с фенилгидразином.....	33
Химические свойства углеводов: алкилирование.....	33
Химические свойства углеводов: осциллирование.....	34
Химические свойства углеводов: кетоновая защита.....	34
Химические свойства углеводов: образование гликозидов.....	35
Лекция 4. Дисахариды. Аминокислоты.....	36
Глюкозные дисахариды.....	36
Лактозные дисахариды.....	38
Аминокислоты.....	40
Классификация аминокислот.....	43
Лекция 5. Полисахариды.....	45
Полисахариды растений.....	45
Полисахариды животных.....	47

Полисахариды бактерий	49
Прочие полисахариды.....	49
Лекция 6. Разбор задач. Продолжение темы аминокислот.	51
Разбор задачи №1	51
Разбор задачи №2	53
Классификация аминокислот	54
Лекция 7. Уровни структурной организации белков. Часть первая.....	57
Остаток классификации аминокислот.....	57
Первичная структура белка	59
Лекция 8. Уровни структурной организации белков. Часть вторая.....	64
Невалентные взаимодействия	64
Вторичные структуры белка	68
Лекция 9. Уровни структурной организации белков. Часть третья.	72
Складчатые листы	72
Сверхвторичные структуры белка.....	73
Уровень структурных доменов	75
Уровень глобулярного белка.....	76
Четвертичные структуры белка	77
Лекция 10. Ферментативная кинетика. Часть первая.	80
Двухстадийная схема Михаэлиса-Ментен.....	81
Методы линеаризации уравнений	85
Лекция 11. Ферментативная кинетика. Часть вторая.	87
Классификация ферментов.....	88
Эффекторы.....	89
Общая схема ингибирования	90
Полное конкурентное ингибирование.....	91
Определение констант	92
Полное неконкурентное ингибирование.....	93
Лекция 12. Разбор задачи по ферментативной кинетике.	95
Лекция 13. Разбор задач. Посттрансляционные модификации.	98
Разбор первой задачи	98
Разбор второй задачи	98
Посттрансляционная модификация белка	99

Лекция 14. Сворачивание белков.....	105
Исторические этапы изучения сворачивания.....	105
Сворачивание в вакуумных модельных системах	106
Кинетика сворачивания	108
Лекция 15. Сворачивание белков (окончание).....	112
Ферменты сворачивания.....	113
Стабильность белков.....	115
Типы стабильности	118
Лекция 16. Стабильность белков.	121
Механизмы необратимых инактивационных взаимодействий.....	122
Выделение и очистка белков.....	125
Лекция 17. Выделение и очистка белков (продолжение).....	129
Стратегии работы при выделении и очистке.....	129
Лекция 18. Выделение и очистка белков. Часть третья.....	138
Фракционирование осаждением	138
Лекция 19. Хроматографический и электрофоретический методы очистки белков.	147
Классификация хроматографических процессов.....	147
Типы хроматографии по типам белков	149
Гель-фильтрация	150
Распределительная хроматография	152
Ионообменная хроматография.....	152
Аффинная хроматография.....	156
Электрофоретические методы	156
Лекция 20. Фибриллярные белки.....	160
Ключевые примеры фибриллярных белков.....	160
Лекция 21. Липиды. Мембраны.	169
Классификация липидов	169
Биомембраны	175
Лекция 22. Энергетика живого.	189
Молекула АТФ	189
Нуклеиновые кислоты	190-211

Лекция 1. Введение.

Сегодня у нас вводная лекция. Что мы будем изучать и как? Когда у нас была пятилетняя программа, на 3-м курсе было распределение, и после введения в специальность следовала биохимия на 4-м курсе. Затем специалитет преобразовался в 6-летний формат, и два курса стали параллельными. Поэтому первые несколько будут посвящены “**Введению в специальность**”, а далее последует курс “**Биохимии**”.

Итак, что мы будем изучать? Объекты живой природы. Согласно этому плану, мы пройдем несколько тем. Но главное для нас - узнать, что такое **основные классы биологически активных соединений**. Живая природа от неживой отличается по довольно многим параметрам. Но заранее скажу, что основное внимание будет уделено белкам и их строению. Однако, помимо этого мы затронем также и *сахара*, поговорим о *липидах* и *мембранах*, а также о *нуклеотидах*.

Что касается белков, мы поговорим *о структурной организации, о выделении и очистке, о свертываемости белков, о фибриллярных и глобулярных белках, а также о ферментативном катализе.*

Базовый тест для проверки исходных знаний

[Далее последует простой тест из 10 вопросов]

1. Формула любой канонической аминокислоты с асимметрическим атомом углерода с трёхбуквенным кодом.
2. Физический смысл pK_a .
3. Формула или название любой неканонической аминокислоты + название или указание объекта или процесса, в которых она задействована.
4. Что “делает” фермент трипсин?
5. Сравните V_{max} и K_m .
6. αD -глюкоза: а) проекция Фишера, б) проекция Хеуорса, в) конформационная формула.
7. Самый распространённый на Земле полисахарид у животных (с указанием единицы измерения).
8. Нарисовать нестандартную пару с водородными связями T — C.
9. Любой фосфоглицерид с названием (или формулой).
10. Основная функция биомембран.

Я немного прокомментирую возможные ответы. Когда мы доберёмся до аминокислот, мы обсудим, что такое pK_a . Каноническая аминокислота - это такая кислота, которая может быть включена в состав растущего белка в процессе трансляции на рибосоме. Это аминокислота, до которой может добраться транспортная мРНК и которую можно привести в раствор на рибосому. Иными словами, это та аминокислота,

которую можно обнаружить в универсальном генетическом коде. При этом, существует огромное количество аминокислот (это может быть α , β , γ), которые важны, но не каноничны. Кто-то нарисовал орнитин, а есть ещё цитруллин, и они входят в так называемый цикл мочевины, таким образом животные выводят азот из организма. Многие аминокислоты появляются также в ходе модификаций.

Хочу обратить ваше внимание, что трипсин в модельных системах (в отличие от организменной работы) не только катализирует гидролиз *пептидной* связи, но и *амидной* и *сложноэфирной*. Трипсин работает в желудочно-кишечном тракте, поэтому можно считать, что он работает не внутри, а снаружи организма и внутри клеток.

V_{max} - это максимальная скорость ферментативной реакции (моль/литр), а **K_m** (константа Михаэлиса) имеет совершенно иную размерность, поэтому они не подлежат сравнению.

Меня порадовало, что в вопросе о полисахариде никто не предлагал целлюлозу и крахмал. Вы продемонстрировали понимание, что есть полисахариды бывают *растительными*, а бывают и *животными* (и *бактериальными*). Здесь в первую очередь имелись в виду **гликоген** и **хитин**. Хитин - это внешний покров многих членистоногих и насекомых, а гликоген - это запасной полисахарид животных (аналог крахмала у растений).

Что касается нестандартной пары Т — С (тимин - цитозин), ничто не мешает им образовать водородные связи. Это могут быть даже ошибочные спаривания. В частности, у организма есть система репарации, либо могут быть следы мутации, и т.д. Да, конечно есть **правило Чаргаффа**, но есть масса исключений из него в живой природе. И вообще, есть альтернативные варианты спаривания. Более того, даже *Уотсон* и *Крик* вначале рисовали не *двухцепочечную* связь, а модель *трёхцепочечной* связи. В организме есть некоторые примеры и трёхцепочечной спирали, поэтому не будем заложниками базовых представлений.

С **фосфолипидами** дело обстоит хуже. Два хвоста жирнокислотной группы связаны сложной связью с остатками глицерина, а внизу связь проходит через *фосфатную группу* (ОН-группа глицерина и остаток ортофосфорной кислоты). По идее, ожидалось появление “головы” в виде этаноламина, серина или другого.

Все говорили в основном об *избирательной проницаемости*, но я для себя сформулировал это так: **главная функция биомембран - барьерная**. В результате, *внутри* создаётся среда, отличная от того, что есть снаружи.

Сейчас у нас развилка: мы можем заняться аминокислотами, а можем начать с углеводов с переходом на белки. Я бы предложил второй вариант.

Отличия живой и неживой природы

Но перед тем, как начать рассмотрение углеводов, я бы хотел прояснить некоторые отличия неживой и живой природы:

- 1. Гомеостаз.** Мы все постоянно взаимодействуем со средой (являясь неравновесной системой), обмениваясь с ней веществом и энергией. Но при этом мы не можем изменять этот обмен внутри нас. Иными словами, у живых существ должны быть механизмы поддержания постоянного состава и свойств параметров системы внутри, вне зависимости от окружающей ситуации. Соответственно, эти механизмы реализуются посредством отдельных метаболических процессов как на уровне *отдельной взятой клетки*, так и на уровне *целого организма*.
- 2. Воспроизводство:**
 - а) Консервативность информации.** Она хранится в виде ДНК, и у организма есть безусловные механизмы удержания этой информации в неизменном виде. Если бы этого не было, происходили бы постоянные мутации, которые итак происходят ввиду адаптации к изменяющимся условиям, но они надстраиваются над изначальной сохранностью исходной генетической информации.
 - б) Матричный синтез.** Классический пример - **репликация**, то есть удвоение генетической информации, а также процессы **транскрипции / трансляции**, когда одна из существующих биомолекул является матрицей для синтеза копий по определённым правилам.
- 3. Ограниченный жизненный цикл.**
- 4. Ограниченный набор классов соединений.** Мы указали основные из них: *белки, нуклеиновые кислоты, сахара и липиды*. Вспомним также про *витамины, изопреноиды*, а также промежуточные продукты циклов *трикарбоновых кислот* и аналогичных циклов (*альфа-кетокислоты*). Можно вспомнить также про *воду, минеральные соли* (для создания правильной ионной связи) и *буферные компоненты* (потому что процессы требуют присутствия буфера).
- 5. Огромное разнообразие объектов внутри классов.** Достигается это за счёт *модульного* строительства из *базовых* кирпичиков в каждом классе. В результате получается огромное разнообразие строений.
- 6. Ферментативный катализ.** Действительно, 99.9% процессов в организме протекают при помощи и непосредственном участии *ферментов*. Сразу вспомним, что **ферменты** - это биологические катализаторы, а любой катализатор по окончании цикла приходит в *исходное состояние*, будучи способны осуществлять множество оборотов одного и того же реагента. Реагенты традиционно обозначаются как *субстраты*. Что важно отметить: ферменты не оказывают никакого влияние на положение термодинамического равновесия системы (в равной степени ускоряют прямую и обратную реакции).

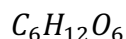
Тем самым, мы констатируем, что есть ряд существенных отличий. В ближайшее время мы рассмотрим с пунктами 4 и 5, то есть с классами **биологически активных соединений**. И начнём мы с **углеводов**.

Углеводы

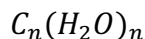
Довольно долгое время то, что мы сегодня называем *биохимией*, в Средние века имело название - **алхимия**. Какими были основные задачи? Одной из них было *здоровье* и *бессмертие* (изобретение эликсиров молодости и т.д.), а другой - *богатство* (поиск способов получения золота). Реализация этой цели требовала финансирования. Алхимические “лаборатории” процветали. И если вторая цель была более сложно достижимой, то в реализации первой цели алхимия значительно преуспела. Но тем не менее, это была не совсем наука <= Не было целенаправленного движения с пониманием принципов, которые лежат в основе тех или иных наблюдаемых явлений. Более того, в то время господствовала **теория витализма**, которая утверждала, что неживой природой заниматься можно и нужно, а вот познать сущность живого человеку не дано. Признавалось существование *живого духа*, благодаря которому всё одухотворено и работает.

Самая серьёзная пробоина этой теории была нанесена в конце 18 века, когда в лаборатории синтезировали *мочевину*. Это простое, но органическое соединение. После этого начались многочисленные иные исследования, которые осуществляли органические преобразования, которые поставили теорию витализма под вопрос. Все процессы, происходящие в организме, подчиняются ровно тем же самым закономерностям, которым подчиняются любые другие химические реакции.

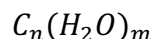
Началось изучение *объектов живой природы* вокруг. Вокруг много растений, поэтому первым делом взялись за них. При исследовании растений обнаружилась **глюкоза** (самый распространённый моносахарид). Когда изучили глюкозу, поняли её химический состав:



Далее выяснилось, что есть и другие углеводы, и можно выявить общую формулу:



А потом озадачились также *олигосахаридами* и *полисахаридами* и поняли, что можно записывать формулу так:



Поняли, что углеводы - это уголь и вода, отсюда и родилось название класса. Но при этом углеводами стали называть и некие другие соединения, которые породили терминологическую путаницу. Поэтому надо понимать, что есть углеводы, а есть их **производные**. Такое распространённое в мире вещество, как *дезоксирибоза*. не

описывается формулой полисахаридов. А есть ещё молекулы, которые содержат азот (например, *глюкозамин*) или серу.

Углевод - это полиол, содержащий помимо этого карбонильную группу.

Классификация углеводов

Есть вопрос: сколько минимально атомов углерода может быть в углеводе? Три: то есть у нас должны быть две ОН группы, связанные с разными углеродами + карбонильная группа. Вооружившись этим знанием, введём некоторую **классификацию**. Стоит заметить, конечно, что классификация не есть панацея, потому что рано или поздно мы дойдём до объектов, которые будут выходить за пределы тех или иных ячеек (классификация затрагивает некие крайние случаи, не учитывая промежуточные). Итак, наша классификация пройдёт по 4-м основаниям.

Во-первых, углеводы классифицируются по степени полимеризации:

1. **Моносахариды.**
2. **Олигосахариды.**
3. **Полисахариды.**

Во-вторых, углеводы (моносахариды) классифицируются по числу атомов углерода:

- 1) *триозы* (3)
- 2) *тетрозы* (4)
- 3) *пентозы* (5)
- 4) *гексозы* (6)
- 5) *гептозы* (7)

Почему мы не идём дальше семи? Потому что в природе существуют углеводы, у которых есть не более семи атомов углерода. Всё остальное - это производные углеводов. Но в лаборатории (*искусственно*) можно произвести углеводы и с большим числом атомов углерода.

Во-третьих, углеводы (моносахариды) классифицируются по типу карбонильной группы:

1. *альдозы* (альдегидная группа)
2. *кетозы* (кето-группа)

Во-четвёртых, углеводы (моносахариды) классифицируются по геометрии:

1. *линейные*
2. *циклические* (если циклизация возможна, то в уравнении всегда будет в каком-то соотношении и линейные, и циклические формы)

Этот признак выбивается из ряда предыдущих, поскольку там всё было построено по принципу дизъюнкции (или-или), а геометрия может быть разной у одного и того же вещества.

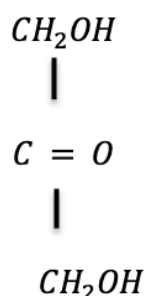
Способы изображения моносахаридов

Я ранее просил вас изобразить *ad*-глюкозу в проекциях *Фишера*, *Хеурса* и в конформационной формуле.

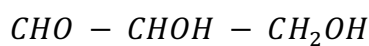
Проекция Фишера создаётся по определённым правилам. Если у нас есть один асимметрический атом, мы должны нарисовать крестик, в центре которого и стоит этот атом (углерода):



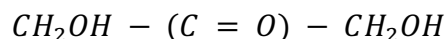
Самую окисленную группу пишут сверху:



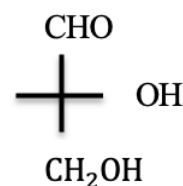
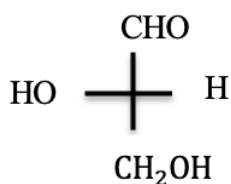
Простейшая *альдоза* (глицеральдегид) записывается следующим образом:



В таком написании мы ничего не можем сказать о *стереоизомерии*. Простейшая кетоза выглядит единственным способом и называется *дигидроксиацетон*:

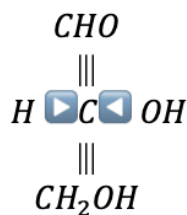


С *глицериновым альдегидом* возникают две возможности:

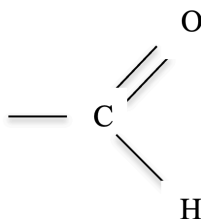


В первом случае мы имеем *L'* проекцию, а во втором - *D'* проекцию. Надо понимать, что это не формулы, а именно проекции, лежащие в плоскости. Более того, надо заметить, что обозначения L и D установлены *конвенционально* и не следуют ни из каких химических причин.

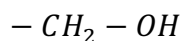
Я предложу также схему перехода к проекции *RS*.



Но ситуация не патовая, потому что *карбонильная группа* выглядит вот таким образом:



а *гидроксильная* вот так:

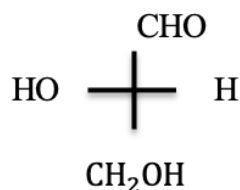


В одном случае связь *одинарная*, а в другом - *двойная*. Если попалась кратная связь, то надо массу умножить на кратность (либо воспользоваться порядковым номером в таблице Менделеева). Итак, вся эта конструкция имеет форму *тетраэдра*, где я через плоскость смотрю на “головное” соединение.

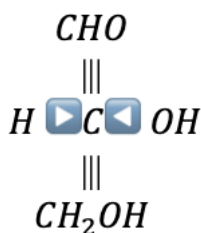
Будем считать, что мы тем самым начали наш разговор об углеводах.

Лекция 2. Способы изображения моносахаридных молекул.

На прошлой лекции мы записали общую формулу и дали строгое определение углеводов. Мы также ввели некую классификацию, которая должна помочь нам рассматривать моносахариды, а затем уже в подходе к более сложным сахаридам. И наконец, вспомнили о проекции Фишера и о том, как от неё перейти к абсолютной конфигурации асимметрического атома углерода.



В этом случае используется *L'* проекция. А если использовать тетраэдрическую проекцию, то мы имеем следующее:



D, L, R, S-проекции

Соответственно, возникает вопрос, есть ли однозначное соответствие между этими двумя проекциями? Конечно, нет. Есть такие две аминокислоты: *L*-серин и *L*-цистеин.

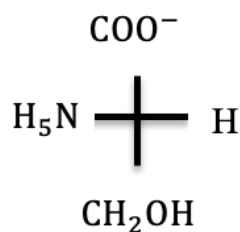


Рис. 2.1. S-Ser

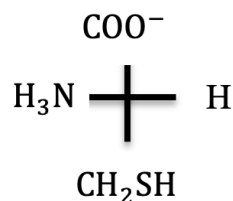
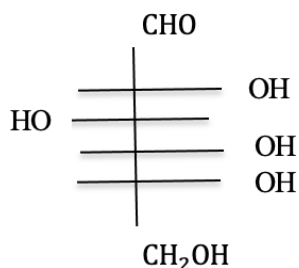


Рис. 2.2. S-Cys

Давайте попробуем расставить старшинство. Понятно, что в случае сирина это: COO (2), H₃N (+1), H (4), CH₂-OH (3). Теперь посмотрим, что будет в случае цистеина: COO (2), (H₃N) (3), H (4), CH₂-OH (2). Получается, что в случае сирина мы имеем *L*-проекцию, а в случае цистеина - *R*-проекцию. Таким образом, мы приходим к пониманию, что эти две проекции не являются взаимосвязанными.

Помимо глицеринового альдегида, существует, к примеру, *d*-глюкоза:



Второй, третий и четвёртый и пятый атомы углерода здесь - асимметрические. При них OH группы смотрят в разные стороны. Если есть несколько асимметрических центров, то принадлежность к D или L-ряду устанавливаются, делая выбор по асимметрическому центру, наиболее удалённому от самой окисленной группы (последней). В данном случае, по пятой. Если она смотрит вправо, то это D, а если влево, то L. То есть D и L определяется для всего соединения, но лишь по одному асимметрическому центру.

В то же время, R и S определяется для каждого асимметрического атома углерода (это конкретная характеристика).

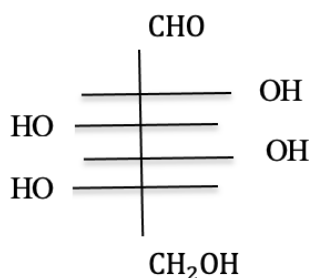
Все эти проекции не имеют прямого отношения к наблюдаемым свойствам. В то же время, разные стереоизомеры ведут себя по-разному. Они обладают многими сходными свойствами, но также и отличия. Одно из них - **взаимодействие с активным центром фермента**. Практически во всех случаях *фермент специфичен либо к одному, либо к другому изомеру*. Другой случай - это **удельное вращение**. Если у нас есть свет, который *плоско поляризован* (свет, пропущенный через волновой фильтр с настроенной плоскостью), то его можно разложить на сумму двух составляющих (плоскостей по и против часовой стрелки, отклонённых на один и тот же угол). Выясняется, что когда свет проходит через раствор или кристалл оптически активного соединения, то правая и левая составляющие *по-разному взаимодействуют с веществом*. В результате мы имеем

плоскость, повёрнутую в одну из сторон. И это уже - физическое свойство. Если эта плоскость вращается по часовой стрелке, то она обозначается $d (+)$. Если же плоскость вращается против часовой стрелки, то она обозначается $l (-)$.

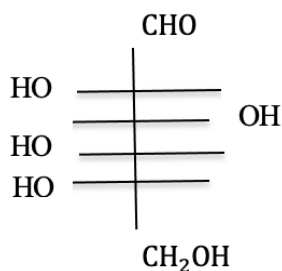
Получается, что все три метрики (D' и L' ; R и S ; d и l) говорят о разном. Никакого однозначного соответствия между ними нет.

Поговорим о *d-глюкозе*. Сколько стереоизомеров она имеет? 16, то есть 2^n в степени n (где n - это количество асимметрических центров). Сколько же нам нужно уникальных названий *альдогексоз*, чтобы назвать все её стереоизомеры? 8, потому что у нас есть вариант D и вариант L .

Я хочу дать вам два варианта и провести голосование об L :

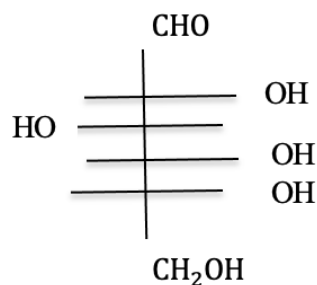


Это первый вариант. Обратите внимание на расстановку OH -групп. Далее посмотрим на второй вариант:

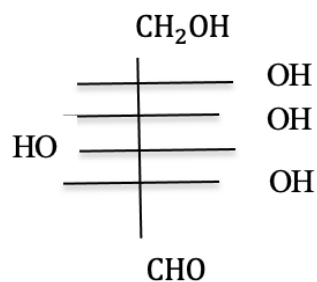


Правильный вариант - второй. Глюкоза похожа на перчатку, потому что в ней несколько асимметрических центров, ответвлённых подобно пальцам. Если мы поменяем одну перчатку на другую (правую на левую), правая станет левой? Нет. Что нужно сделать, чтобы это произошло? Необходимо полностью “отразить” перчатку. Точно также, в первом случае у нас получилась некоторая L -альдегидроза, но не глюкоза. А во втором случае мы раскрутили глюкозу таким образом, что получилось полное зеркальное отражение. Это актуально не только для проекции Фишера, но и вообще для любого другого способа представления молекулы.

Двинемся дальше. Где можно ставить R и S ? Отражать можно под разным углом.



Отражаем снизу, и получается следующий вид:



Вроде бы, эти формулы не очень похожи. Но мы ведь помним правило, что проекцию Фишера нельзя выводить за плоскость доски. Если мы хотим повернуть её, нужно осуществить это в пределах плоскости. В таком случае, всё станет на свои места при обратном развороте.

В живой природе обычно встречаются D-сахара, нежели L. Мне требуется ввести понятие эпимеры. Для этого я нарисую ещё две альдогексозы. У одной из них при втором атоме углерода гидроксильная группа смотрит влево:

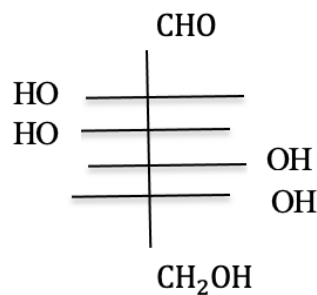


Рис. 2.3. D-манноза

И ещё один сахар:

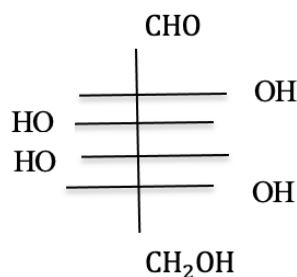


Рис. 2.4. D-галактоза

Два соединения называются **эпимерами**, если они различаются ориентацией заместителей только у одного атома углерода. Глюкоза и манноза являются эпимерами по второму атому углерода: у них всё одинаково, кроме ориентации во втором ряду. А глюкоза и галактоза являются эпимерами по четвёртому атому. А являются ли эпимерами манноза и галактоза? Нет, потому что они различаются по ориентации двух атомов углерода.

Давайте теперь рассмотрим *кетозы*. Я напишу одну из самых распространённых кетоз:

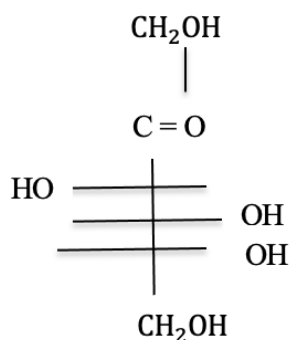


Рис. 2.5. D-фруктоза

На какую из альдоз похожа D-фруктоза? А похожа ли на маннозу или галактозу? Есть такой способ: если нужно назвать кетозу, то очень часто берётся название альдозы с добавлением суффикса “ул”. Я нарисую два сахара, которые хорошо бы выучить. Сперва альдозу:

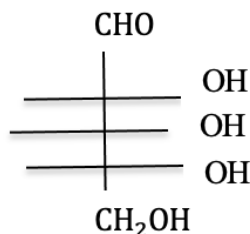


Рис. 2.6. D-рибоза

А теперь родственную ей кетозу:

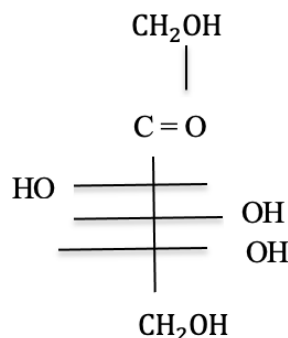


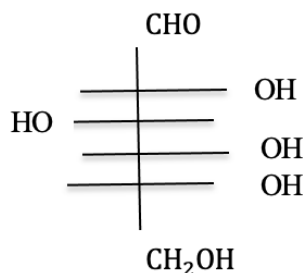
Рис. 2.7. D-рибулоза

По аналогии, мы имеем полное право *фруктозу* обозначить как *глюкулозу*. А как будет выглядеть маннулоза? Точно также. Фруктоза является одновременно и *глюкулозой*, и *маннулозой*, потому что карбонильная группа оказывается вверху, и нам не важно, куда смотрит OH.

Правило: Чем более длинный одинаковый хвост у сахароз, тем более близкие они родственники. Фруктоза, глюкоза и манноза принадлежат к одному семейству, а вот с галактозой у них малый повторяющийся хвост. Это проявляется также в **метаболических процессах**: когда мы познакомимся с **гликолизом**, мы увидим, что организму практически всё равно, переваривать глюкозу, маннозу или фруктозу. А вот с галактозой требуются три дополнительных ферментативных стадии.

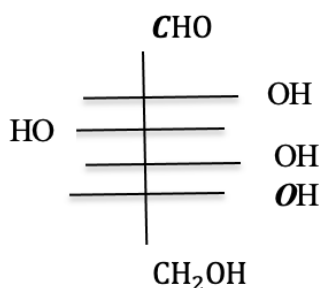
Шестичленные молекулярные циклы

Мы говорили о том, что молекулы могут быть представлены в линейной и циклической форме. Давайте перейдём к обсуждению того, как и какие образуются циклы. Возьмём в пример *глюкозу*. Как мы знаем, **циклы** бывают **пятичленные** и **шестичленные**. Если для каких-то молекул возможны 3,4,7-членные циклы, то для углеводов характерны именно два указанных цикла. Возьмём в пример опять глюкозу:



Мы знаем, что в органической химии практически всё происходит благодаря тому, что где-то есть *частично положительный*, а где-то *частично отрицательный* заряд. Так начинается химическая реакция. Где у нас положительный заряд в молекуле глюкозы? На карбонильном атоме (CHO). А где тогда отрицательный заряд? На всех кислородах (O), пусть и не совсем одинаковый. Тогда нам надо подобрать правильный атом, который будет “атаковать” карбонильную группу.

Для глюкозы это практически всегда шестичленный цикл, и атака проходит по выделенному атому углерода со стороны атома кислорода:



Как называется продукт взаимодействия карбонильной и гидроксильной группы? Фактически, у нас образуется внутренний *полуацеталь*. Его можно записать в проекциях.

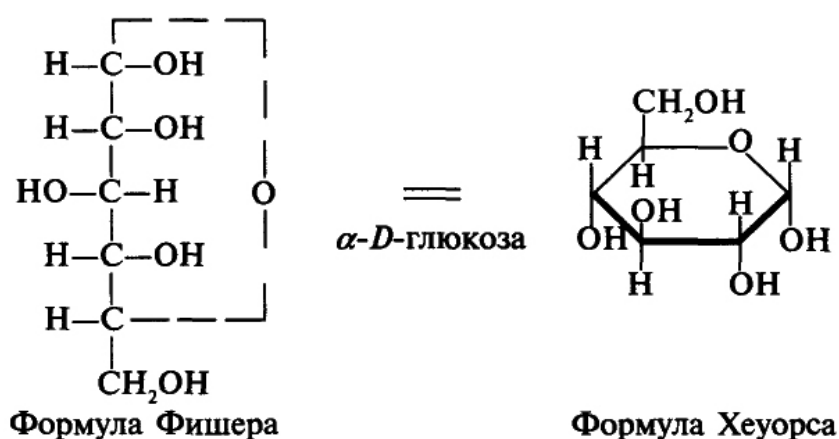


Рис. 2.8. α -D-глюкоза в проекциях Фишера и Хеурса

Надо понять один момент касаясь *формулы Фишера*: кислород (O) в линейной формуле был внизу и превратился в O, перечёркнутый пунктиром. А водород (H) ушёл в обозначение OH-группы. У нас появился новый асимметрический центр, и стало 32 стереоизомера.

Что касается *формулы Хеурса*, то здесь плоскость перпендикулярна плоскости доски. Её можно отражать и поворачивать целиком. Атомы нумеруются по часовой стрелке от 1 до 6 (CH₂OH). Чтобы легко ориентироваться в этих формулах, нужно запомнить одно простое правило: **всё, что смотрит вправо в формуле Фишера — это вниз в проекции Хеурса, и наоборот, всё что смотрит влево в формуле Фишера — это вверх в проекции Хеурса**. Теперь нам осталось разобраться с гидроксильной группе, которая находится при первом атоме углерода, и тогда это *α-D-глюкопираноза* (если OH наверху, то это была бы *β-D-глюкопираноза*).

Сахара в форме шестичленных циклов называются **пиранозами** (в честь Пирана), а сахара, которые существуют как пятичленные циклы, называются **фуранозами** (в честь Фурана).

Здесь возникает неточность. Мы говорили, что проекции можно поворачивать, и тогда OH группа будет смотреть не вниз, а вверх, и тогда это будет не *α*, а *β*. Поэтому есть ещё одно правило: **если OH-группа и CH₂OH смотрят по разные стороны кольца, то это альфа-изомер, а если по одну, то это бета-изомер**.

Необходимо ввести ещё одно понятие. Два сахара, различающиеся только ориентацией вновь образовавшейся гидроксильной группы (гликозидной группы), называют **аномерами**.

Являются ли альфа и бета D-глюкозы эпимерами? Да, они имеют одинаковую OH-группу. Важный момент здесь состоит в том, что в равновесной смеси в растворе глюкозы будет 0,02% линейной формы. А остальное разойдётся как 2/3 бета и остальное альфа. При этом это - *динамическое* равновесие. Переход из альфа в бета возможен, но *не напрямую*, потому что в таком случае слишком высока энергия активации перехода.

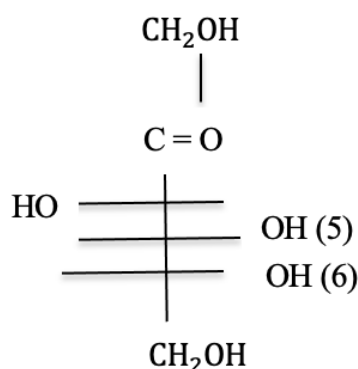
Замечу попутно, что уже говорил, что для гликолиза галактозы нужны три дополнительные стадии. Так вот, они используются для того, чтобы из галактозы сделать глюкозу, то есть раскрутить OH-группу при четвёртом атоме.

Какой бы чистый изомер мы не взяли, если мы растворим его в щелочной воде, то через некоторое время мы обнаружим указанную выше равновесную смесь всех формул. Это соотношение было обнаружено при исследовании оптической активности. Стереоизомеры различаются *оптической активностью* с точки зрения взаимодействия с плоско поляризованным светом.

По *удельному вращению* можно как раз проследить этот эффект. Альфа равновесная смесь - это около 54,5°. Бета равновесная смесь - это около 20°. А в случае альфа-D-глюкопиранозы - это +120°.

Пятичленные молекулярные циклы

Теперь поговорим о пятичленных циклах на примере *фруктозы*.



Что возможно в случае фруктозы? Она встречается в природе в двух формах: *фуранозной* и *пиранозной*. Чтобы была фуранозная форма, гидроксил при атоме атакует центральный углерод? При пятом (5) и шестом (6).

Будете рисовать сахарозу, рисуйте только *фуранозу*, то есть пятичленный цикл. Почему? Это энергетически выгоднее, если говорить в общем. Но если растворить фруктозу в воде, то преимущественной формой будет *пиранозная*.

Формулы Хеуорса

5-членный цикл называется **фуранозным** (фураноза), 6-членный цикл – **пиранозным** (пираноза).

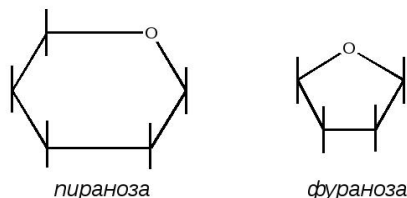


Рис. 2.9. Пиранозный и фуранозный циклы

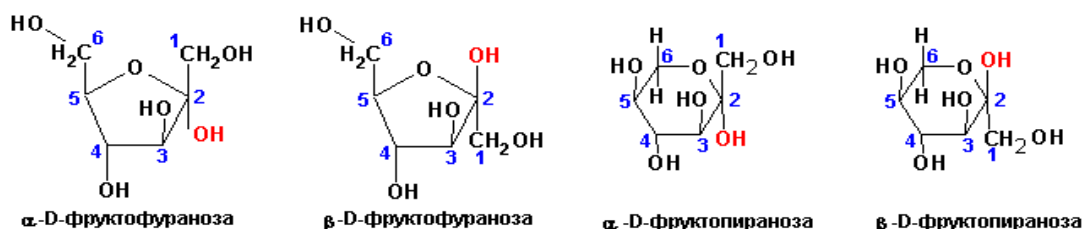
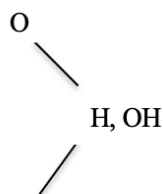


Рис. 2.10. Конфигурации фруктопиранозы

Вообще, в случае фруктопиранозы можно и не говорить об альфа и бета-формах, потому что наблюдается практическая симметрия. Можно это описать при помощи R и S конфигураций углеродных центров.

Если нам не важно, какой из аномеров указан, может появляться общая запись:



Проекция Хеурса глюкозы хороша, но она не передаёт реальную геометрию молекулы.

Формулы Хеурса

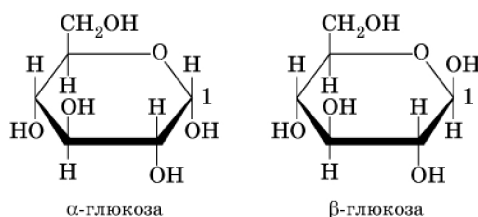


Рис. 2.11. Проекция Хеурса для глюкозы

Всё-таки, это проекция на плоскости. А реальная геометрия предполагает *тетраэдральную* форму. На что похожа молекула пиранозы? На *циклогексан*. Для него возможны самые разные конформации. Такого богатства в случае пираноз не наблюдается. Поэтому остаётся только вариант “*кресло*”. С другой стороны, появляется кислород наряду с пятью углеродами, поэтому можно указать и другие “*кресла*” (рисунок 2.12.).

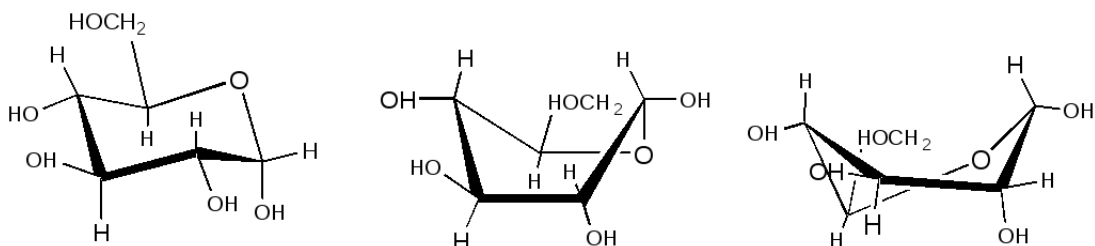


Рис. 2.12. Конформации глюкозы

Важно то, что эти формы *не эквивалентны*. Давайте попробуем перейти от Хеурса к конформациям. Правило: если мы давим кольцо в ту же сторону, куда смотрит **ОН-группа**, она остаётся **перпендикулярной**, а если кольцо смотрит в другую сторону, то **ОН-группа выходит практически в плоскость**.

Заместитель, который абсолютно перпендикулярен плоскости кольца, называется **аксиальным (а)**. Заместитель, который находится практически в плоскости кольца, называется **экваториальным (е)**.

Существует правило, что чем больше экваториальных заместителей, тем более стабильной и преобладающей оказывается формула (более энергетически

выгодной). Соответственно, между двумя виценальными и экваториальными, или экваториальными и аксиальными группами возможны водородные связи. А между двумя виценальными и аксиальными - нет, потому что ОН-группы выходят на разные стороны.

Мы будем позже разбираться с *невалентными взаимодействиями*, к числу которых относятся водородные связи, хотя эти взаимодействия характерны и важны не только для углеводов, но и для белков, липидов, биомембран.

Водородная связь является частным случаем электростатического взаимодействия. В электростатике заряды рассматриваются как точечные. Соответственно, у нас дельта- на кислороде одной группы ОН, и дельта+ на водороде другой группы ОН. И далее по **закону Кулона**:

$$F_{\text{Кул}} = k \frac{q_1 q_2}{r^2}$$

$k = 9 \cdot 10^9 \frac{\text{Н} \cdot \text{м}^2}{\text{Кл}^2}$ для воздуха

q_1 – заряд 1 – ого точечного тела
 q_2 – заряд 2 – ого точечного тела
 r – расстояние между центрами тел

Рис. 2.13. Формула закона Кулона

Сейчас нам важно то, что r^2 . Иными словами, сила водородных связей сильно зависит от *расстояния*, и с его увеличением падает сила электростатического взаимодействия. В случае двух соседних экваториальных расстояние достаточно близкое для того, чтобы электростатическое взаимодействие протекало нормально.

В случае соседства экваториальных и аксиальных расстояние значительно больше, и понятен соответствующий эффект. Если бы у нас был случай *бета-глюкозы*, счёт аксиальных / экваториальных будет не 1а4е (как в случае с *альфа-глюкозой*), а будет 0а5е.

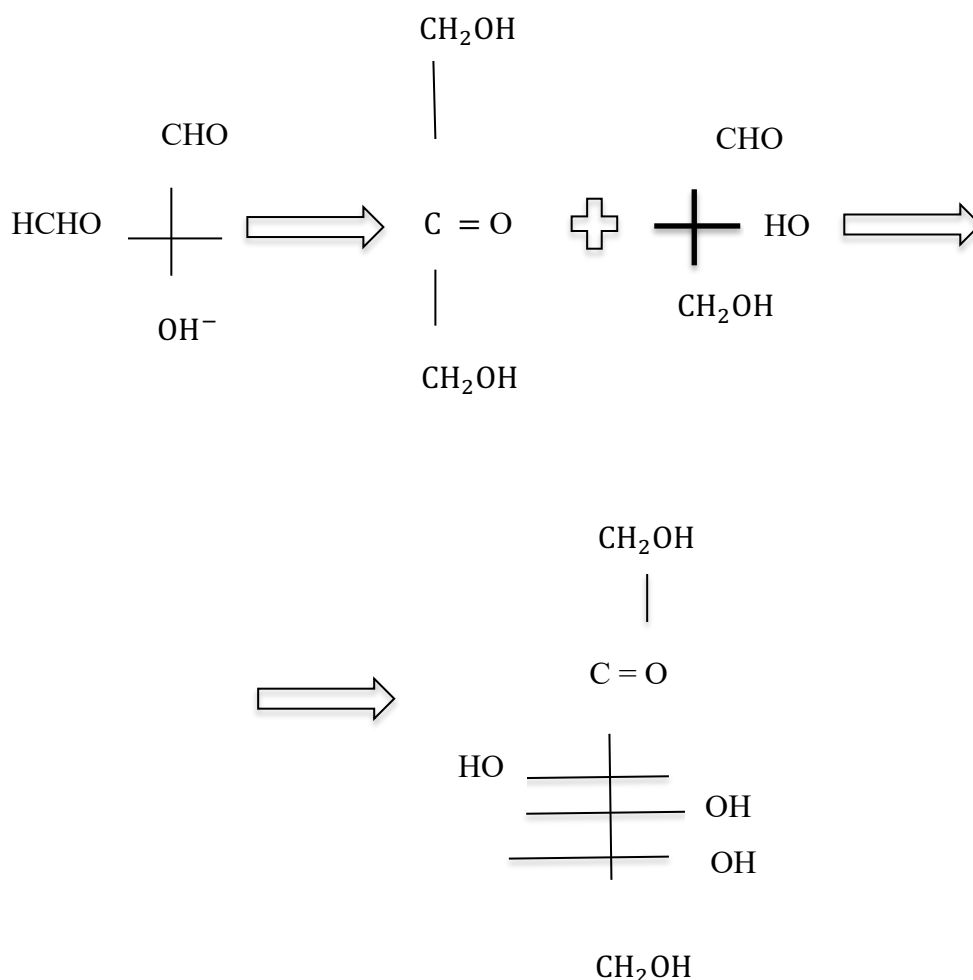
Итак, мы разобрали различные способы представления углеводных молекул. **Проекция Фишера** наиболее эффективна для изображения *линейных* формул. С *циклическими* формулами гораздо очевиднее **проекция Хеуорса**. Что касается конформационной формы, то её необходимо знать, но её гораздо сложнее построить.

Лекция 3. Методы углеводного синтеза.

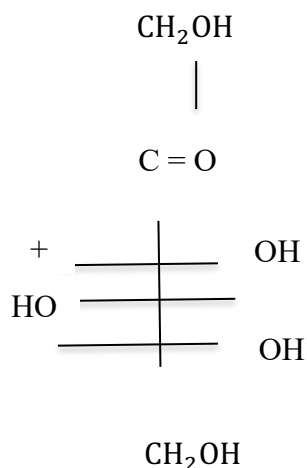
На предыдущей лекции мы говорили о способах представления моносахаридных углеводных молекул. Мы успели рассмотреть проекции Фишера, Хеуорса и конформационные формулы. Теперь же мы обсудим **методы удлинения углеводной цепи**. Не все из них актуальны, но какие-то из них задействуются в лабораторной практике.

Метод Бутлерова-Лёва

Итак, **метод Бутлерова и Лёва**. Из двух формальдегидов в кислой среде может получиться гликольальдегид, то есть происходит конденсация.



Далее образуется *ацетон* и *глицеральдегид*, а затем *D-фруктоза* и *D-сорбоза*.



Таким образом, получается сиропная смесь различных моносахарид.

Метод Килиани-Фишера

Этот метод появился несколько позже, чем метод Бутлерова и Лёва, но всё же в начале XX века. В 1908 году Э. Фишер получил нобелевскую премию за работы с углеводами и азотистыми основаниями.

Можно брать любой стартовый сахар в начало реакции. В данном случае мы рассмотрим *D*-арбинозу (Рисунок 3.1.).

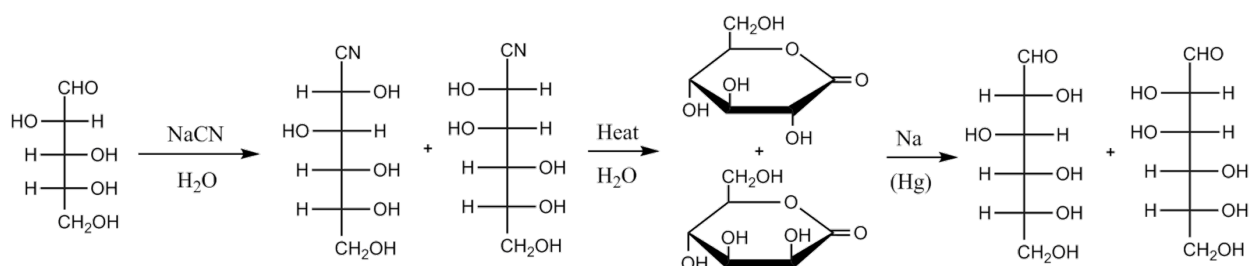


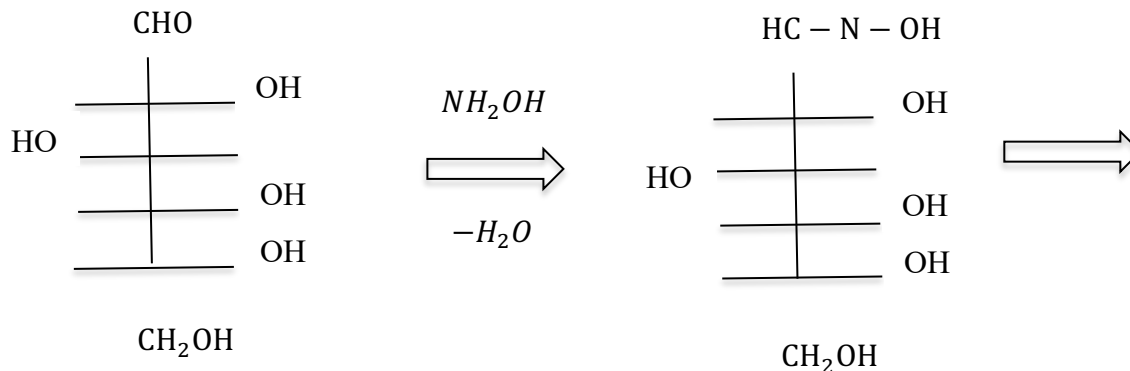
Рис. 3.1. Метод Килиани-Фишера для *D*-арбинозы

Если это дело подвергнуть кислотному гидролизу, то получится вот такой класс соединений: лактон. И далее восстановление с помощью амальгамы и натрия, что даст нам на выходе *глюкозу* с *маннозой*. То есть, используя **метод Килиани-Фишера**, мы можем получить два готовых продукта. Их можно разделить и провести следующие наращивания, и т.д.

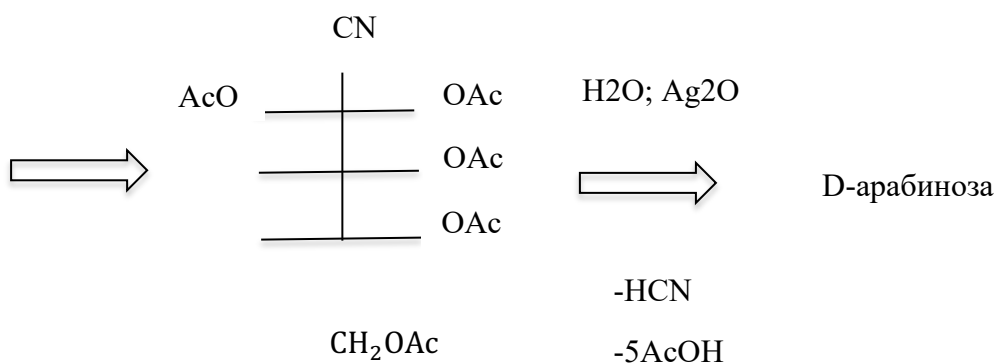
Раз мы имеем возможность наращивать цепочки углеводов, то мы должны иметь возможность также и сокращать их.

Дегградация углеводов

1. Дегградация углеводов по Волю.



Мы получаем *альдоксим*. Если его обработать шестью эквивалентами уксусного ангидрида, то вверху окажется *группа CN*, а внизу *производная глюкозы*. Затем если провести гидролиз в аммиачном растворе оксида серебра, уходит *HCN*, укорачивается цепочка и происходит окисление (уходят 5 уксусных кислот).



2. Дегградация углеводов по Руффю.

С той же *D-глюкозой* производится реакция *декарбоксилирования*. Получаем *D-арабинозу*.

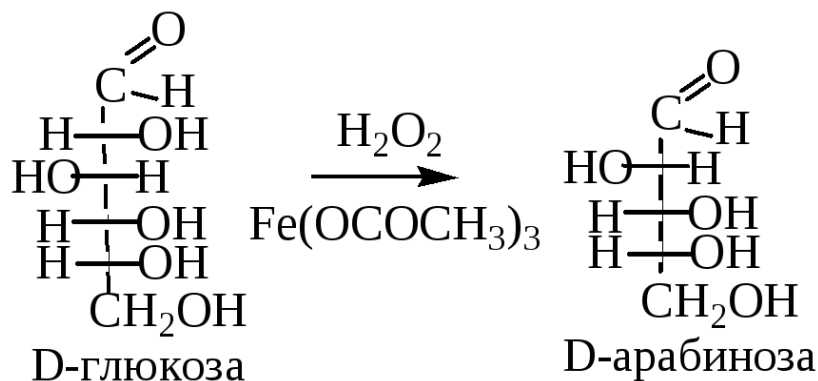


Рис. 3.2. Декарбокислирование D-глюкозы

Таким образом, синтетическая органическая химия позволяет нам как наращивать цепочки углеводов, так и сокращать их.

Химические свойства углеводов: окисление

Первое свойство - **окисление**. Оно бывает разных видов. Если берём глюкозу и несильный окислитель (например, Br₂), то окислению будет подвергнута только одна группа OH.

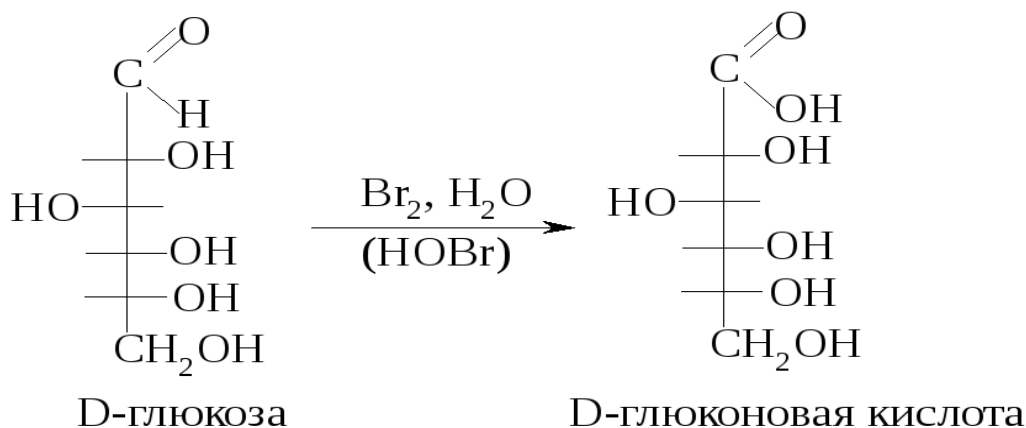


Рис. 3.3. Окисление

У моносахаридов есть две наиболее подверженных окислению группы: *первая и последняя*, потому что преобладающей формой является пиранозная. В качестве продукта мы получаем *D-глюконовую кислоту* (Рисунок 3.3.). Обратите внимание, мы использовали суффикт “он”. Класс называется **альдоновые кислоты**.

Если использовать для окисления HNO₃, то окислению будут подвергнуты обе группы, и мы получим дикарбоновую *глюкаровую кислоту* (Рисунок 10). Её название предполагает использование суффикса “ар”. Класс называется **альдаровые кислоты**.

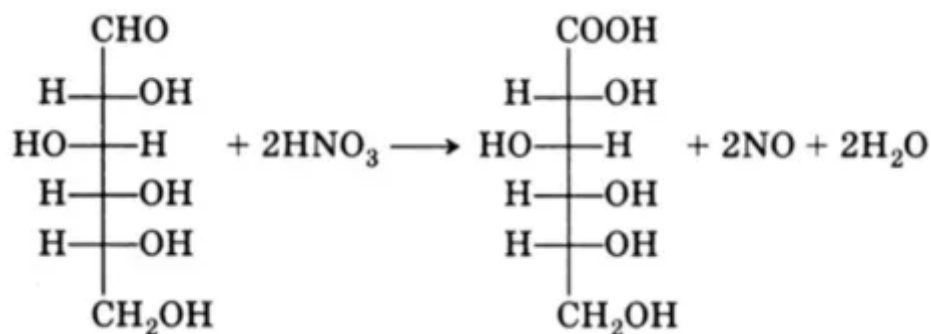


Рис. 3.4. Окисление с помощью HNO_3

Для особых любителей оптических эффектов можно заметить, что при этом окислении происходит *обращение абсолютной конфигурации* пятого атома углерода. Так бывает, что производные разных сахаров бывают одинаковыми соединениями.

И есть также случай, когда у нас связь *гликозидного гидроксила* (при полуацетальной связи) *не свободна, но связана с остатком*. В таком случае переход в линейную форму невозможен, поэтому может помочь только *проекция Хеуорса* (Рисунок 3.5.).

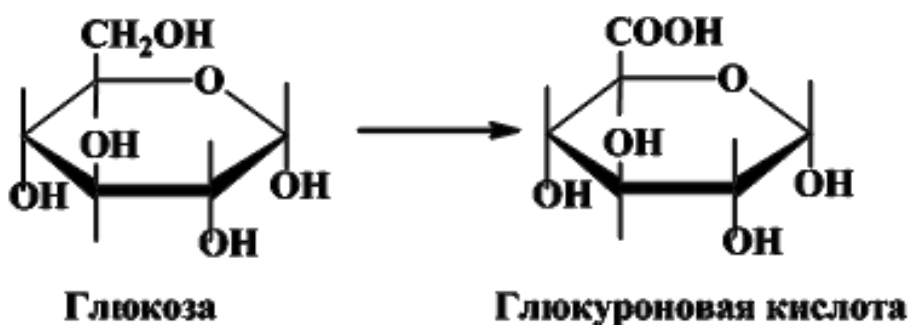


Рис. 3.5. Невозможен переход к линейному виду

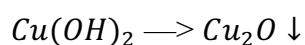
Соответственно, единственная группа, которая способна к окислению, это шестая OH-группа. В таком случае в остатке выйдет *глюкуроновая кислота*, образованная суффиксом “ур”. Класс называется **уроновые кислоты**.

Когда стали интенсивно исследовать углеводы, начали разрабатывать способы измерения их количества. Были предложены так называемые **именные реактивы** (или жидкости). Модификации этих методов до сих пор используются в пищевой промышленности, например, для проверки качества. Основные жидкости мы перечислим:

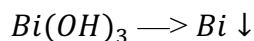
1) **Реактив Толленса:**



2) **Реактив Фелинга:**



3) Реактив Ньюленда:



Понятно, что жидкости Толленса и Фелинга гораздо более широко распространены и применимы.

Есть также реакции с использованием H_5IO_6 . Если мы не можем перейти в линейную формулу, то обработка не очень большими концентрациями приведёт к тому, что будут частично расщепляться С-С связи. Этот метод, увы, не селективен. Эта реакция используется на практике, при этом мало кого волнует, какая именно связь порвётся.

Есть 96-луночный планшет. Имеется *антиген*, связанный с лункой, и второй, плавающий свободно. Мы добавляем *антитело*, и образуются иммунные комплексы. Можно сначала сделать калибровку, проверить сигнал, и, после добавления аналита, проверить калибровку вновь. Остаётся один интересный вопрос: как увидеть, что образовался *иммунный комплекс*? Берутся вторичные антитела на прежние антитела, и к ним пришивают фермент. Происходит реакция субстрата и продукта, которая регистрируется, в частности, флуоресцентным способом. Сшивание антитела и фермента не должно повредить участки связи. Антитело - это белок (*иммуноглобулин*). Соответственно, на помощь приходят *углеводы*. Дело в том, что антитела являются гликопротеинами (у них есть углеводные части - 5% от массы). Но этого достаточно, чтобы обработать их каким-либо реагентом, тем самым частично разорвать связи, и из образовавшейся карбонильной группы подшить белок через аминокруппы. Получается основание Шиффа, но его можно восстановить до одинарной связи. И так далее.

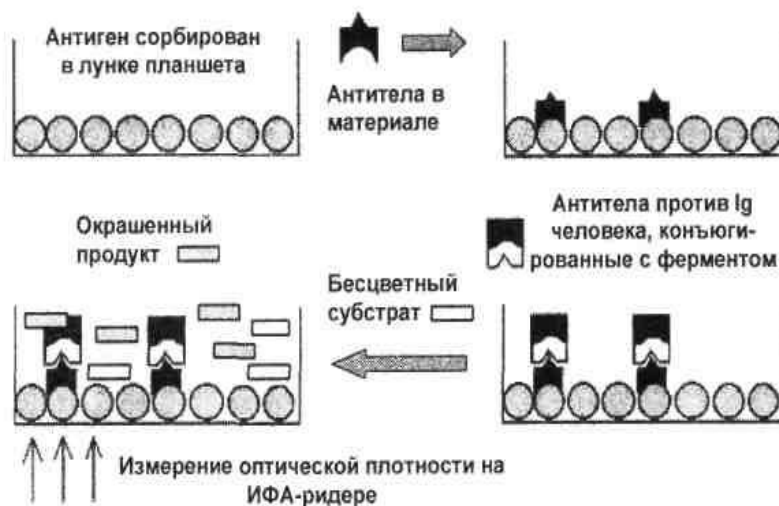
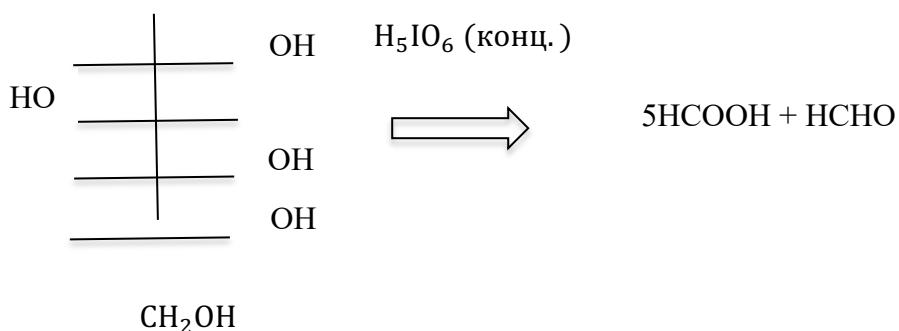


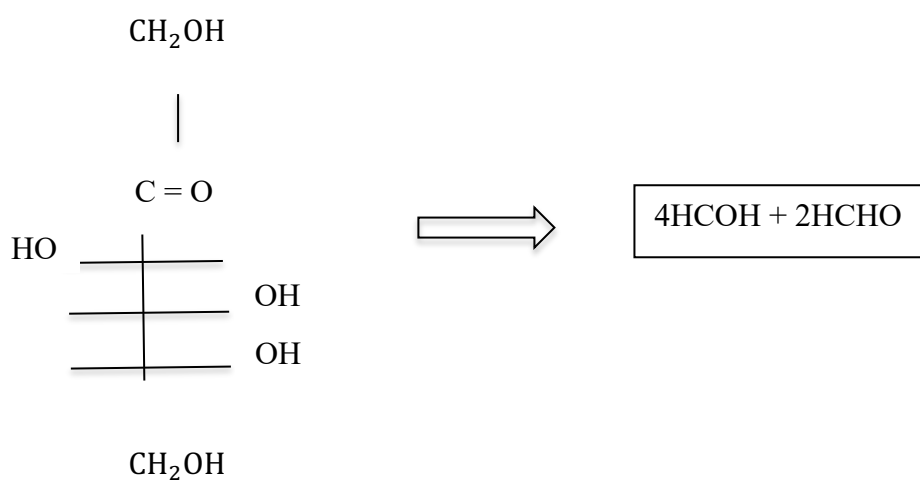
Рис. 3.6. Реакция субстрата с продуктом

А что будет, если взять избыток? Порвутся все С-С связи, получится *формиа* и *формальдегид*.

СНО



Есть даже правило, согласно которому, **при каждом разрыве происходит двухэлектронное окисление**. Все вторичные группы должны быть разорваны с двух сторон, и только первичная - единожды. А теперь посмотрим на *фруктозу*:



Мы получаем 2 *формальдегида* и 4 *формиата*. Эта реакция была опубликована в начале XX века. Но метод оказался сильно неточным.

Химические свойства углеводов: восстановление

Второй тип реакции - **восстановление**. Мы берём глюкозу и восстанавливаем её в мягких условиях. Чаще используют *амальгаму натрия*. В итоге получаем шестиатомный спирт, то есть *сорбит* (Рисунок 3.7.).

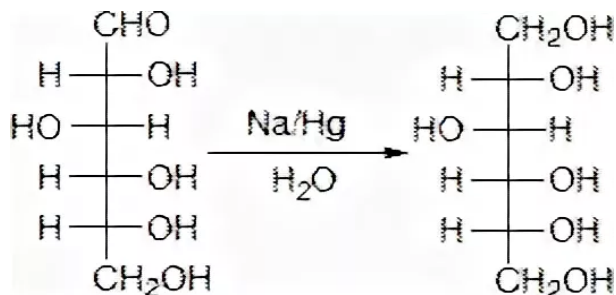


Рис. 3.7. Восстановление глюкозы

Точно также берём теперь *маннозу*, восстанавливаем и получаем спирт *маннит* (Рисунок 3.8.).

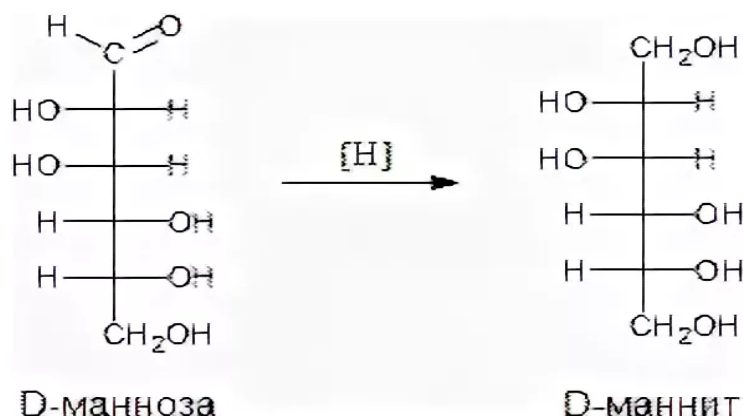


Рис. 3.8. Восстановление маннозы

А если мы возьмём *фруктозу*, то восстановив её, получим *сорбит* и *маннит* (Рисунок 3.9.).

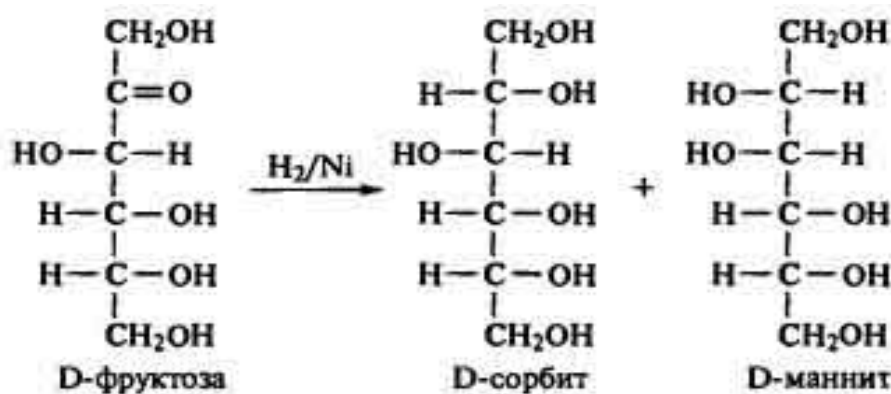


Рис. 3.9. Восстановление фруктозы

Это ещё раз говорит нам о родственности этих трёх соединений. Они принадлежат к одному классу.

Химические свойства углеводов: перегруппировка

Следующая реакция - **перегруппировка Лобри-де-Брюинна — Ван-Экештейна**. Они обнаружили, что если взять *глюкозу*, *маннозу* или *фруктозу*, в слабощелочной среде через некоторое время мы обнаружим смесь всех трёх соединений (Рисунок 3.10.).

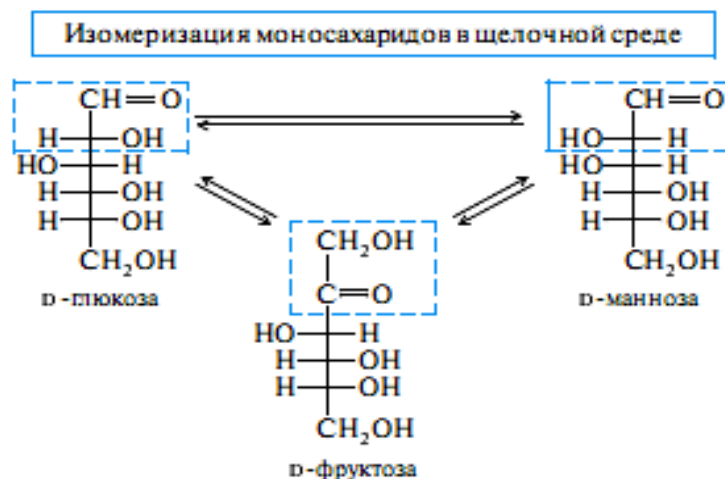


Рис. 3.10. Перегруппировка Лобри-де-Брюинна — Ван-Экештейна

Принято считать, что **реакция серебряного зеркала** не должна идти с фруктозой. Очень часто берут фруктозу, начинают делать реакцию, а она идёт отлично. Дело в том, что если она успела насытиться воздухом, то там уже есть вода и смесь всех трёх сахаров.

Химические свойства углеводов: дегидратация

Четвёртая реакция и свойство - **дегидратация**. Я запишу *пентозу* с помощью формулы Фишера. Если взять H_2SO_4 и нагреть, то останется *фурфурол*. Соответствующую реакцию можно провести и с *гексозой*, и тогда мы получим *оксиметилфурфурол* (Рисунок 3.11.).

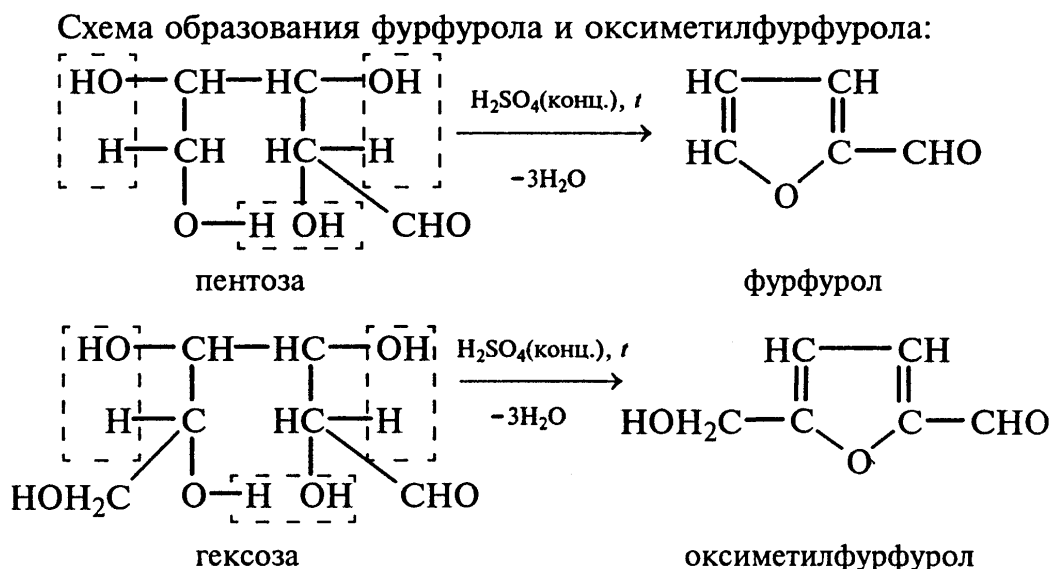


Рис. 3.11. Схема дегидратации

В некоторых учебниках по органике многие учебники ставят точку. Но зачем нужна эта реакция? Но если сюда добавлять какие-то соединения, то начинают образовываться большие *окрашенные* комплексы молекул. Конечная цель - двинуться дальше, чтобы получить в итоге *полуколичественный* и *количественный* анализ углеводов.

Химические свойства углеводов: взаимодействие с фенилгидразином

Данная реакция начинается с *глюкозы*. Далее мы берём *фенилгидразин* и получаем производную *озон D-глюкозы* и *анилин* (Рисунок 3.12.).

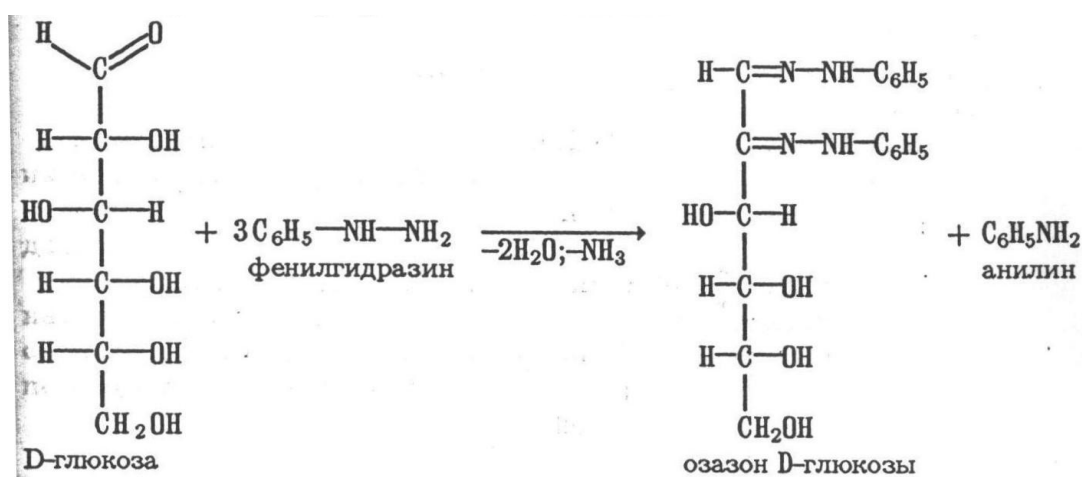


Рис. 3.12. Взаимодействие с фенилгидразином

В своё время была длительная дискуссия: присоединяется первая молекула, а потом вторая окисляет положение и присоединяет следующую, либо сначала идёт окисление, и две молекулы присоединяются. Актуальность этой реакции сошла на нет.

Чем интересны **озоны**? Они очень *интенсивно окрашены* в жёлто-красной гамме. Кроме того, они различаются по *температуре плавления*: от 170 до 230 градусов. *Фишер* с коллегами использовали эту реакцию для идентификации различных моносахаридов.

Можно также взять два эквивалента фенилгидразина и снять два гидразина. Остаётся дикарбонильная производная. Класс соединений - **озоны**. А такая реакция называлась бы **переальдегидирование**. Далее, используя реагент в виде *амальгамы натрия*, мы получаем *D-фруктозу*.

Химические свойства углеводов: алкилирование

Существуют реагенты, которые позволяют **алкилировать** OH-группу. Берётся *глюкоза* в сочетании с *йодистым метаном* (или, например, с *диметилсульфатом*). Получается производная в виде простого эфира. В данном случае - *пентаметил-α-глюкоза* (Рисунок 3.13.).

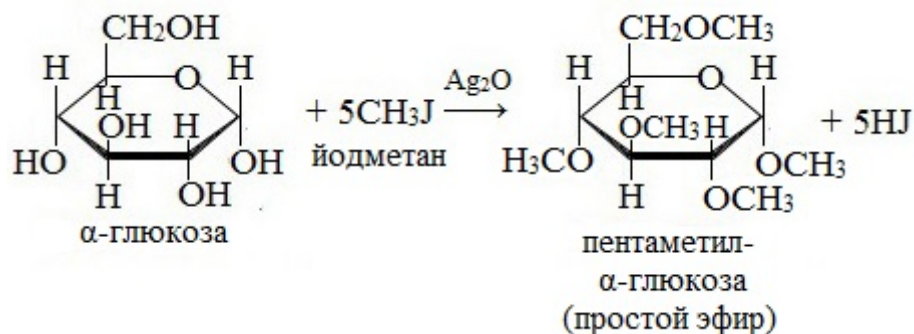


Рис. 3.13. Реакция алкилирования

Есть также более *селективные* реагенты. Если взять и продуть HCl в метаноле, селективно метилируется только первое положение. А можно взять очень большой реагент, для которого будет доступна только 6-я группа, на которую придётся ставить защиту. Проведя дополнительную реакцию, далее можно в кислой среде снять защиту.

Алкилирование широко используется для установления структуры олигосахаридов. Если мы метилируем олигосахарид, а потом его гидролизуем до моносахарида, то по занятым алкилированным и неалкилированным группам можем понять, какие группы задействовались для связи.

Химические свойства углеводов: осциллирование

Чаще всего для **осциллирования** глюкозы используют *уксусный ангидрид* (не в водной среде). Получается *пента-О-ацетил-глюкоза*.



Рис. 3.14. Реакция осциллирования

Если добавить к этому HBr₂, то получится HBr, а всё остальное будет ацилированным. Эта реакция демонстрирует аномальные реакционные способности первой и последней OH-групп.

Химические свойства углеводов: кетоновая защита

Мы помним, что продуктом реакции альдегида с эквивалентами одно-гидроксильных групп является *полуацеталь*, с двумя гидроксильными группами -

полный *ацеталь*. А с кетоном? Если взять ацетон (один эквивалент), у нас будет смесь, но основным продуктом будет *полный ацеталь с ацетоном*. А что, если взять ещё один эквивалент? Одна защита уже есть в виде продукта. Если мы взяли два эквивалента, без защиты может остаться 1,4,6 группы.

Это, таким образом, обратимая защита. Обычно это делается, чтобы получить *конкретную группу*, например, 6-ю. Подбирая условия, это можно реализовать. Далее с этой группой можно что-то сделать, а затем снять защиту.

Полуацетали могут образовываться между двумя *виценольными* экваториальными группами, либо между аксиальной и экваториальной группами. Между двумя аксиальными группами они не могут образоваться. Что здесь интересно? Здесь ведь есть некая конформационная подвижность. Как вы думаете, ацетоновая защита *двух экваториальных групп*, или *экваториальной и аксиальной* накладывает большие ограничения на подвижность? Дело в том, что выворачиванием аксиальная и экваториальная превращаются в экваториальную и аксиальную - это *инверсия*. На подвижности ацетона это не скажется. А две экваториальные превратились бы в две аксиальные. В таком случае подвижность серьёзно ограничивается.

Химические свойства углеводов: образование гликозидов

Обратите внимание, что здесь имеются в виду *гликозиды*, а не *глюкозиды*. По этому поводу есть большая путаница. Гликос - это относится в целом к сахарам. А глюкос - это относится ко глюкозе. В процессы *гликолиза* вовлекаются разные сахара, полимеры и дисахариды. А обратный процесс - *глюконеогенез*.

Здесь важно, что не только глюкоза может образовывать гликозиды. Что это такое? Эта группа, обладающей реакционной способностью, при *полуацетальной связи* (при циклизации) может вступать в реакции с разными соединениями. Чаще всего, со *спиртами* и *фенолами*. Это служит образованию простой эфирной связи. Чаще всего там встречается SN-2 механизм с обращением. В результате мы получаем класс **гликозидов**.

В качестве R группы могут выступать самые разные органические вещества. R-ОН называется *агликоном* в гликозидах. **Агликон** - это неуглеводная часть молекул углеводосодержащего соединения. Простейший пример - *фенол*, от которого образуется *фенолгликозид*. Могут быть существенно более сложные соединения. Их активно изучают, потому что они обладают достаточно интересными свойствами, как полезными, так и вредными.

Если в качестве R-ОН придёт другой моносахарид, мы получим *дисахарид*.

Лекция 4. Дисахариды. Аминокислоты.

Как уже стало ясно, мы ведём разговор об углеводах. Мы начали с определения классификации углеводов, а также выделили их способы представления, из которых мы отдельно выделили *проекцию Фишера* и *Хеурса*, и *конформационную формулу*. После этого, мы приступили к изучению химических *свойств* углеводов. Вначале мы выяснили, как можно *наращивать* цепи углеводов. Самым базовым методом наращивания является метод *Килиани-Фишера*, который позволяет получать два продукта, с которыми можно далее работать. Потом мы узнали, как их можно *сокращать*. И здесь равно применимыми являются методы *Воля* и *Руффа*. Наряду с этим мы рассмотрели и ряд иных реакций, в разной степени актуальных.

Мы закончили на разговоре о *гликозидах* и о том, что есть гликозидный гидроксил, и если в качестве “агликона” используется другой моносахарид, то у нас получается *дисахарид*. Сейчас мы познакомимся с этим классом поближе.

Глюкозные дисахариды

Сейчас мы рассмотрим способы их изображения. В *проекции Хеурса* это делается довольно просто, путём обозначения *соединения* двух глюкоз. У нас получается G1-1a-4-Glc (Рисунок 4.1.). Это *мальтоза*, или солодовый сахар.

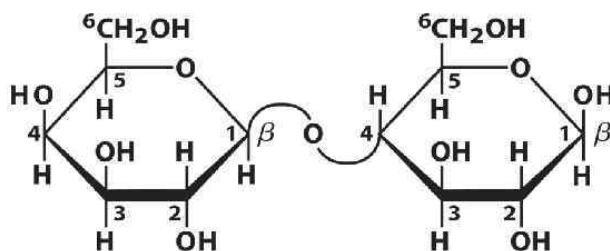


Рис. 4.1. Мальтоза

Давайте обозначим её теперь в *конформационной форме*:

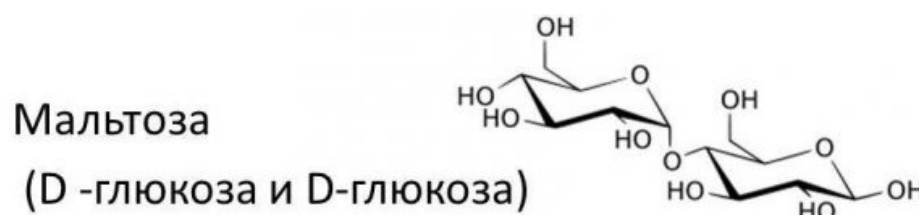


Рис. 4.2. Мальтоза в конформационной форме

Очевидно, что первая схема проще, но вторая лучше на том основании, что более наглядно указывает на линии соединений, где есть CH₂-группы, а где их нет. Поэтому, даже рисуя проекцию Хеурса, нужно отдавать себе отчёт, где отсутствуют эти группы.

Собственно говоря, небольшой штрих уже делает из мальтозы *целлобиозу* (Рисунок 4.3.).

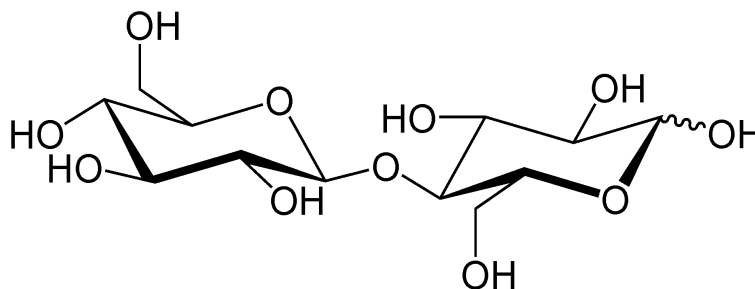


Рис. 4.3. Конформационная форма целлобиозы

Интересный факт: понятие **pH** и нам подарил *Сёренсен*, который был в начале 20 века сотрудником компании Carlsberg. Таким образом, солодовый сахар привнесла пивоваренная промышленность.

Мальтоза - очень легко гидролизуемый сахарид, поскольку является компонентом запаса. Фермент, который это делает, называется *мальтаза*. Более того, не ферментативно, а в результате реакции мальтоза тоже очень легко расщепляется до двух глюкоз. А вот с *целлобиозой* гидролиз провести сложно, и далеко не у всех организмов есть ферменты, которые позволяют это сделать. Да и в целом, и целлюлози, и целлобиоза гораздо менее подвержены химическому расщеплению, чем мальтоза. С чем это связано конкретно - сказать трудно.

Двинемся дальше. Могу ли я сказать “*бета-мальтоза*”? Конечно, ведь есть тот или иной способ соединения остатков моносахарид (α или β). Таким образом, альфа или бета связь определяет вид монохрида. В то же время, мы не знаем, какой из аномеров раскрывается в линейную форму. Соответственно, могут быть оба варианта по мальтозе и по целлобиозе.

С точки зрения химических реакций эти соединения относятся к *редуцирующим* сахара: *правое* звено переходит в *линейную* форму и может реагировать с реагентами Толленса, Ньюленда и другими жидкостями. Выяснить, какая из форм будет более стабильной, можно будет с помощью построения конформационных формул. Более того, можно не только окислять, но и *восстанавливать* правое звено моносахарид и получать такие интересные *производные* продукты, у которых слева будет остаток углевода, а справа - остаток шестиатомного спирта (*сорбит*).

Как нужно соединить два остатка глюкозы, чтобы получить *невосстанавливающий дисахарид*? Через группы, ближайšie к центрам свободных O, и тем самым имеем *трегалозу* или *грибной сахар*. Представление является не слишком стандартным, поэтому мы переворачиваем схему через промежуточный шаг и получаем на выходе следующий вид (Рисунок 4.4.):

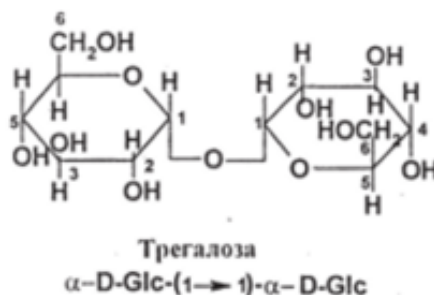


Рис. 4.4. Трегалоза

Стоит отметить, что трегалозы довольно много в грибах (до 30% по массе).

Лактозные дисахариды

Существуют не только глюкозные дисахариды, но и молочные (*лактозные*). Чтобы нарисовать *лактозу*, нужно обратить на эимер по 4-й группе OH. Но как мы с вами уже говорили, слишком далеко от главной окисленной группы находится изменение в 4-й группе. Поэтому галактоза и глюкоза очень сильно оторваны друг от друга по родству.

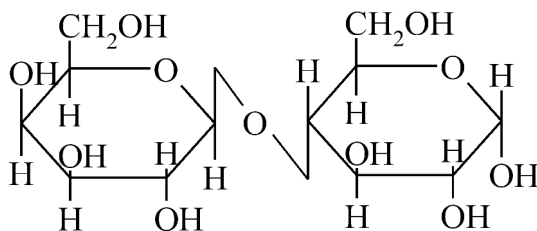


Рис. 4.5. Лактоза

Итак, галактозу мы получаем, изображая эту удалённость (Рисунок 4.5.). Отсюда может быть объяснена *непереносимость лактозы* у некоторых народов. Северные народы в основном относятся к молоку терпимо (поскольку молоко не портится в условиях холода). А у южных народов с этим проблема. Это скорее популяционное свойство. Но есть и реальные сложности с усвоением этого дисахарида. Первая стадия переваривания лактозы (гидролиз внутренней связи) связана с действием фермента *лактаза*. И у некоторых людей есть лактазная недостаточность, то есть патологический вопрос.

У других людей для переработки лактозы, к примеру, задействуется магистральный путь - гликолиз, где ферменты хорошо работают и налажена регуляция, но туда легко попадает глюкоза, фруктоза и манноза. Другие сахара попадают туда с большим трудом, но их и не очень много (кроме галактозы). Поэтому приходится делать *три дополнительных ферментативных реакции* с затратами энергии. Проблемы с усвоением наблюдаются у людей, где не хватает хотя бы одного из трёх необходимых ферментов.

Мы отметим для себя, что лактоза - это *восстанавливающий* дисахарид, и правое звено легко может переходить в линейную форму. А теперь возьмём невосстанавливающий дисахарид: Glc – 1a – 2b – Fru. Мы видим, что гликозидный гидроксил закрыт, и в линейную форму перейти невозможно (даже в кето-форму фруктозы).

Попробуем обозначить её (Рисунок 4.6.):

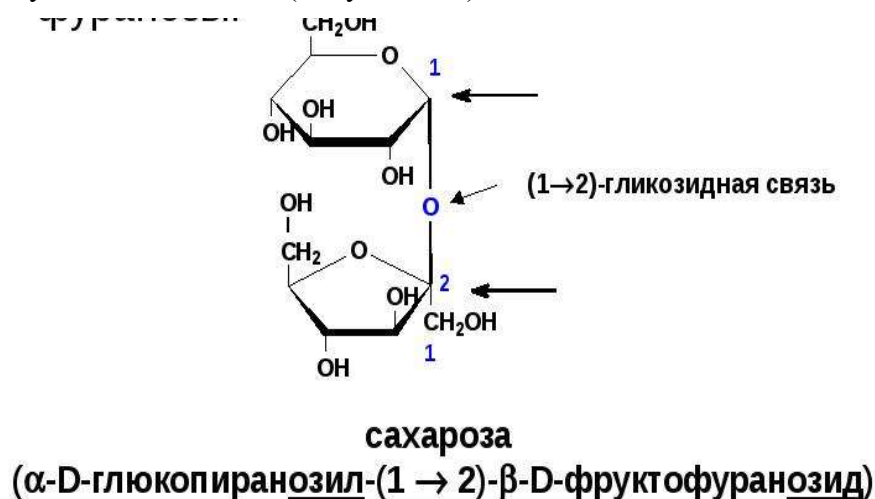


Рис. 4.6. Сахароза

Таким образом, мы получаем *сахарозу*, или виноградный сахар. Это углеводное богатство позволяет получать из него вино. Что ещё нужно отметить? Сахароза усваивается с помощью фермента *сахаразы*. Но у него может быть ещё другое наименование - *инвертаза*. Вообще продукт гидролиза сахарозы называется инвертным сахаром. Дело в том, что глюкоза обобщается с поляризованным светом под углом +54 градуса в равновесной смеси, с плюсом также и сахароза, а вот фруктоза отклоняется сильно влево. Соответственно, если начинать гидролиз, всё начинается с небольшого плюса сахарозы, но по мере появления свободных глюкозы и фруктозы, начинается их реакция, в которой “побеждает” фруктоза: появляется вклад *минуса*. Таким образом, суммарный угол уменьшается до момента инверсии. То есть вращение по часовой стрелке переходит во *вращение против часовой стрелки* (с плюса на минус).

Я покажу вам ещё один сахар, и вот чем он интересен. Далекое не всегда сахара построены только из углерода, водорода и кислорода. Могут появляться и другие атомы, в первую очередь - *азот* и *сера*. К азотсодержащим производным сахара относится, в частности, это *2'глюкозамин* (Рисунок 4.7.).

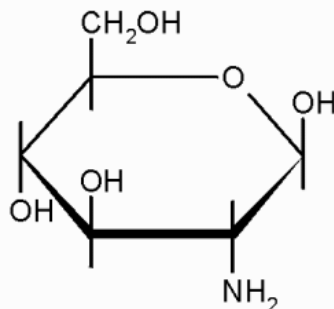
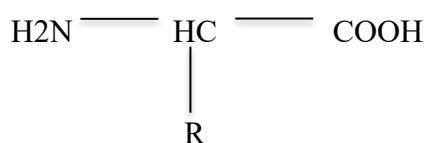


Рис. 4.7. 2'-глюкозамин

Если читать, то книгу *Березина* и *Мартиника*, то только ферментативную кинетику и то - в случаях Михаэлиса. Можно также взять “Принципы выделения и очистки белков” *Скоупса*. Этого более чем достаточно для настоящего курса. По электрофорезу нужен, пожалуй, только *Остерман*. Про метаболизм можно посмотреть по “Биохимии” *Ленинджера*. По липидам и мембранам смотрите “Биохимию и молекулярную биологию” *Эллиота*.

АМИНОКИСЛОТЫ

Скорее всего, в стандартной литературе мы можем обнаружить такую общую формулу:



R - это боковой заместитель (или боковой радикал). Без учёта бокового заместителя, мы видим две ионогенные группы, но не понимаем, в каком они состоянии. И второй момент: если $R \neq -\text{H}, -\text{COOH}, -\text{NH}_2$, то мы получем *c-a*-углеродный атом с 4-мя разными заместителями. На оба этих вопроса не позволяет ответить данная формула.

Давайте попробуем её усовершенствовать. Здесь нам, конечно же, придётся вспомнить уравнение Гендерсона-Хейсельбаха. Итак, что такое кислота? Это некое соединение, способное к диссоциации, которое в упрощённом виде записывается как $\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$

Если есть равновесие, то ему можно приписать константу равновесия. Её следует записывать с использованием заглавной **Ka** (constant of acidity). Далее мы можем записать выражение для Ka:

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

Если логарифмировать по основанию 10 с отрицательным знаком, то мы получаем:

$$\log Ka = \text{Log} \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

И тут мы вспоминаем, что логарифм произведения равен сумме логарифмов. Тогда мы имеем:

$$\text{Log}[H^+] - \text{Log} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

И тут я вспоминаю, что логарифм по основанию -10 принято обозначать буквой p :

$$-\log \equiv p$$

Значит, я могу записать следующее:

$$pKa = pH - \text{Log} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Собственно говоря, это и есть **уравнение Гендерсона-Хейсельбаха**. Оно связывает pKa функциональной группы (табличное значение) с pH среды и логарифмом отношения не протонированной и протонированной формы. Зная любые два элемента, мы всегда сможем найти отсутствующее третье.

Далее я предлагаю перейти к графику зависимости, где отражено отношение доли заряженных групп к среде (pH). Есть карбоксильная группа. При *низких* значениях pH в среде преобладают протоны. Тогда по **правилу ле Шателье**, равновесие сдвинется в сторону *протонированной формы* гидроксильной группы. Соответственно, точка будет близко к 0. Пользуясь той же логикой, мы можем сказать, что при *высоких* значениях pH протонов мало, и всё сдвинется в сторону *карбоксилат-аниона*, на уровень (100;13) по x ; y .

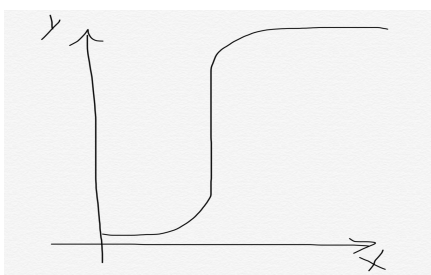


Рис. 4.8. Возрастающий график

Кислотой является *аммонийная группа* (NH_3^+), и именно она будет преобладать при низких значениях pH . А вот сопряжённым основанием является NH_2 , которая преобладает при высоких значениях:

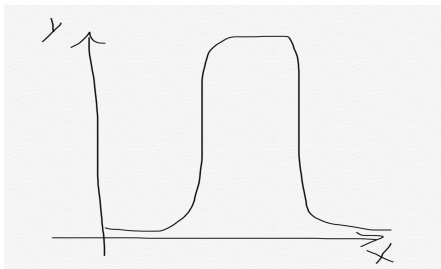


Рис. 4.9. График возрастает и убывает

Очень важный момент состоит в том, что у нас для карбоксильной группы кривая восходящая, а для аммонийной группы - нисходящая. То есть, в протонированном состоянии карбоксильная группа не заряжена, а аммонийная заряжена. Таким образом, мы можем выделить три области. В области один суммарный заряд равен +1. В области три он равен -1. А во второй области он равен 0. Суммарный заряд равен 0, значит преобладает цвиттер-ионная форма аминной кислоты (без учёта бокового заместителя). Большинство живых организмов обитает в средах, близких к нейтральным.

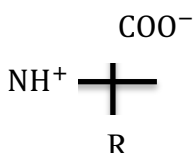
Так вот, возвращаясь к изначальной формуле, проведём расчёт. У нас есть аминокислота, у которой $pK_a(1) = 4$, $pK_a(2) = 10$, $pH = 7$. Какова будет доля полностью незаряженной формы, если протонирование этих групп происходит независимо? Получается, что:

- каждая тысячная часть карбоксильной группы будет в заряженной форме;
- каждая тысячная часть аммонийной группы будет в форме NH_2 (соответственно, каждая тысячная в виде $COOH$, и каждая тысячная в виде NH_2);
- перемножаем $1/1000$ на $1/1000$, становится 10^{-6} .

Таким образом, нельзя сказать, что этой формы нет совсем, но её крайне мало.

Теперь вот какой вопрос. Очень часто в науке рассматриваются половинные параметры. Давайте подумаем, что будет, если мы имеем 50% долю заряда групп. **Физический смысл pK_a** заключается в таком значении pH , что половина групп является протонированной, а половина - депротонированной. Значения pK_a надо знать хотя бы в примерном диапазоне для карбоксильной и аммонийной групп.

Но в дальнейшем я часто буду указывать на аминокислоты в следующем виде:



Кстати, есть мнение, что в природе распространены только *L*-аминокислоты. Это неправильное представление. *D*-аминокислоты также присутствуют в природе. В частности, *олигопептиды* у человека (гормоны-стимуляторы и т.д.). Однако,

в белках действительно встречаются только остатки L-аминокислот. Почему же? Потому что регулярные структуры можно создавать только из одного типа.

Классификация аминокислот

Мы разобрали практически всё, кроме боковых заместителей. Сколько существует **канонических аминокислот**? **22**. Если посмотреть на класс эукариот, то их 20. Двадцать первая - это *селеноцистеин* (который можно найти у бактерий), а двадцать вторая - это *пирролизин* (у архей). Рассмотрим за их исключением оставшиеся 20 аминокислот.

В организме существуют не только канонические аминокислоты, но и неканонические. **Канонические аминокислоты** - это такие аминокислоты, которые могут быть включены в состав растущего белка в процессе трансляции (то есть в процессе биосинтеза белка на рибосоме), либо те аминокислоты, которые мы можем найти в универсальном генетическом коде.

Канонические аминокислоты можно учить по-разному. Я предлагаю делать это по свойствам боковых заместителей. Все аминокислоты (20) можно разделить всего на две большие группы: полярные и неполярные (общий список с формулами - на Рисунке 4.10.). Рассмотрим сначала первую группу.

1. Неполярные

1.1. **Алифатические:** *Ala* (аланин); *Val* (валин); *Leu* (лейцин); *Ile* (изолейцин).

Эти аминокислоты не несут в боковой цепи гетероатомов (N, O, или S), циклических группировок и характеризуются отчетливо выраженной низкой полярностью.

1.2. **Ароматические:** *Phe* (фенилаланин); *Tyr* (тирозин); *Trp* (триптофан).

Это аминокислоты, которые включают ароматическое кольцо. Здесь тоже есть полярность, и при определённых значениях, эта группа может переходить в NH₂⁺. Справочник по биохимии не приводит в классификации *триптофан* на этом основании. В ароматических аминокислотах *боковой заместитель отделён от основной цепочки метиленовой группой*. И ещё один момент состоит в том, как определить *концентрацию* белка: с помощью *спектрофотометрии*. В среднестатистическом глобулярном белке оптическая плотность составляет примерно 1 мг/мл.

Во второй половине XX века начали расшифровывать аминокислотные последовательности белков. Тогда были только слабые вычислительные машины, соответственно, вся информация публиковалась в научных журналах. Обозначения из 300 аминокислотных остатков требовали больших затрат бумаги и чернил. Поэтому были введены *однобуквенные* обозначения.

2. Полярные.

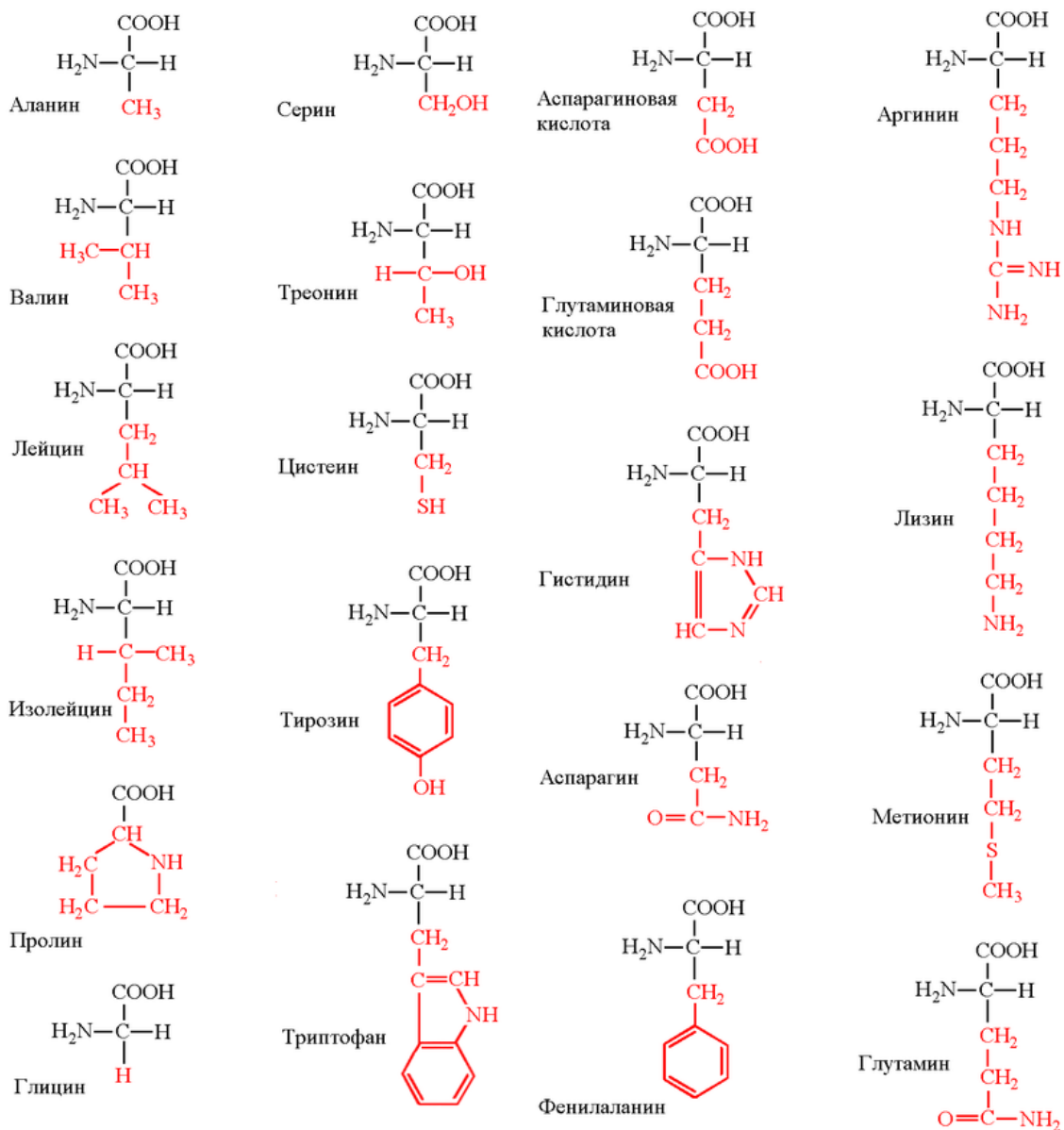


Рис. 4.10. Общий список канонических аминокислот

Лекция 5. Полисахариды.

Вспомним, что на нескольких прошлых лекциях мы прошли способы представления моносахаридов и олигосахаридов. В дальнейшем разговор пойдёт о полисахаридах. Больше всего их в объектах **растительного** происхождения. Главные из них - это *крахмал* и *целлюлоза*. Они имеют существенное различие *по строению* и *по главной функции*. При этом они состоят из остатков одного и того же моносахарида - *глюкозы*.

Полисахариды растений

Крахмал - основной из запасных полисахаридов. Он состоит из двух типов полимеров (Рисунок 5.1.): один из них линейный (*амилоза*), а другой - разветвлённый (*амилопектин*).

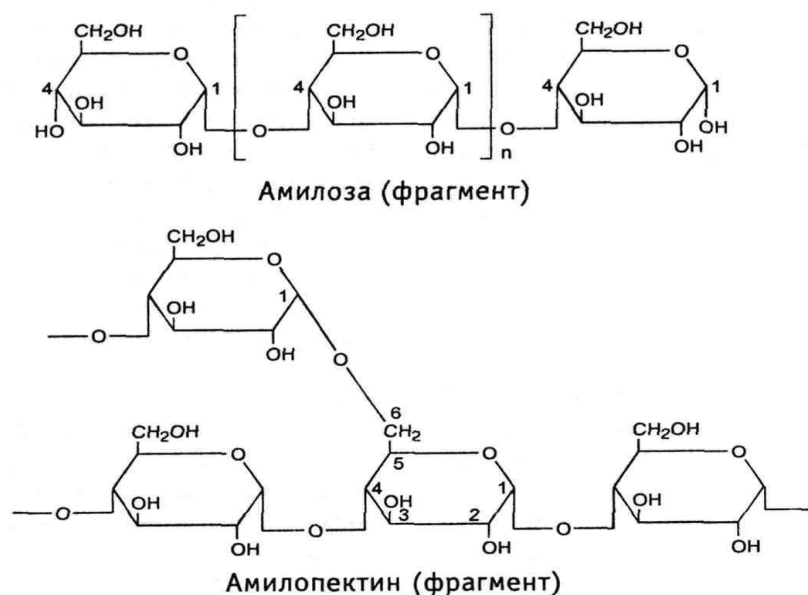


Рис. 5.1. Амилоза и амилопектин

Разветвления имеют место в 6-й CH_2 -группе. **Крахмал** - умеренно упорядоченная структура, организация которого более хаотична, чем целлюлоза. В принципе, крахмал спирализуется. При взаимодействии с йодом, крахмал окрашивается в синий. Это зависит от *длины цепочки крахмала*. Если она составляет от 15 ед. в степени полимеризации, то окраса не будет совсем. А далее, вплоть до 50 ед. идёт окрас по всей цветовой палитре. В итоге мы приходим к синему цвету.

Ещё интересно, что крахмал обладает довольно перемежающейся структурой. Зёрна крахмала в срезе образуют аморфную основу с чередованием *области кристалличности* и *аморфных ламелл*. В первом случае есть очень чёткие образования (через водородные связи), во втором случае - таких образований нет.

Что будет, если нагреть, а затем остудить крахмал? Получится клейкая субстанция (кисель, либо клей для обоев).

В основе крахмала лежит *мальтоза* (кстати, разветвление 1,6 - это изомальтоза). Поэтому соотношение между амилозой и амилопектином варьируется в довольно широком диапазоне (от 1/4 до 4/1). Это легко получаемая и быстро усваиваемая энергия.

В отличие от крахмала, **целлюлоза** (Рисунок 5.2.) плохо гидролизуется и состоит в основном из *линейных полимерных нитей*, построенных из остатков глюкозы, соединённых бета-1-4-полимерной связью. В результате, получаются совсем другие свойства:

- структурным звеном является *целлобиоза*;
- *разветвлений существенно меньше*, и они бывают гораздо реже;
- происходит упаковка, образующая кристаллический пучок молекул, которые вторично перекручиваются в молекулярный “канат” => понятно, что гидролиз осложняется.

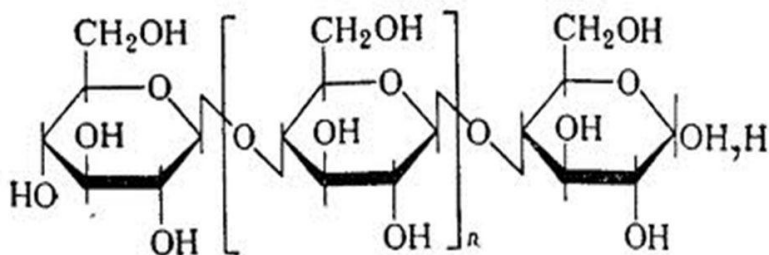


Рис. 5.2. Целлюлоза

У большинства животных нет возможности разлагать целлюлозу. Даже у жвачных животных целлюлозное питание заключается в том, что *желудочный рубец* позволяет с помощью живущих в нём *бактерий* расщеплять прочные 1-4-бета-связи, и уже далее глюкоза всасывается в организм и перерабатывается.

Бывает совсем чистая целлюлоза (*глюкозная*), а бывают вкрапления других моносахаридов (*маннозы, ксилозы, галактозы*), и тогда говорят о **гемицеллюлозах**. Как понять, что они есть? Свежий спил дерева обнаруживает в центре чистую белую субстанцию - это чистая целлюлоза. Но ближе к краевым кольцам начинаются жёлто-коричневые вкрапления. Упаковка меняется, и приобретает цвет. Можно ещё сказать, что не только ферментативно, но и химически, целлюлоза очень тяжело разлагается. Поэтому бумажные фабрики жутко загрязняют окружающую среду.

Целлюлозу, потому что она достаточно инертна и структурно упорядочена, используют в *хроматографии*, обрабатывая её предварительно (разрывая водородные связи) и ковалентно подшивая. Очень часто используется *пятиуглеродный диальдегид*.

Надо иметь в виду, что речь идёт о соединениях, обладающих от раза к разу *устойчивыми свойствами*.

Полисахариды животных

У животных много полисахаридов, но главный из них - это **гликоген** (Рисунок 5.3.). Он представляет из себя такие же цепочки из глюкозных остатков, соединённых 1-а-4-связями. Это фактически *амилоза*, но с разветвлением это становится *амилопектином*.

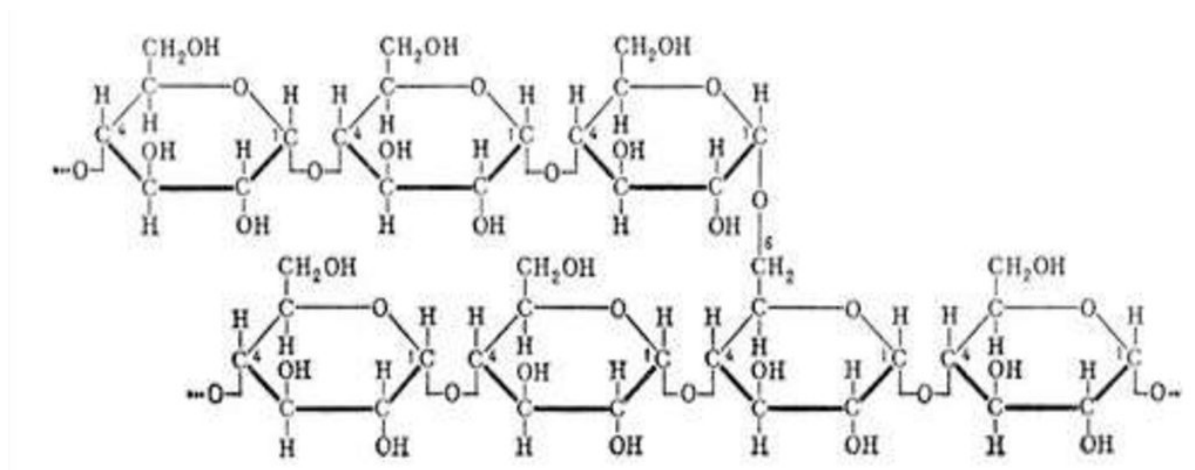


Рис. 5.3. Гликоген

Есть некое отличие, которое заключается в строении клеток. Дело в том, что *животная* клетка имеет гораздо *меньше места*, чем растительная. *Эукариотическая клетка* имеет множество элементов, и всё упаковано очень плотно. Соответственно, запасы нужно хранить максимально эффективно. Оптимальной формой является *шар*, значит требуется *множество разветвлений*. Поэтому гликоген присутствует практически во всех животных клетках, в разной степени.

Помимо гликогена, активно представлен в природе **хитин** (Рисунок 5.4.). Это безумно *инертный полимер*, которого состоят панцири, фаланги и клешни членистоногих и экзоскелеты насекомых.

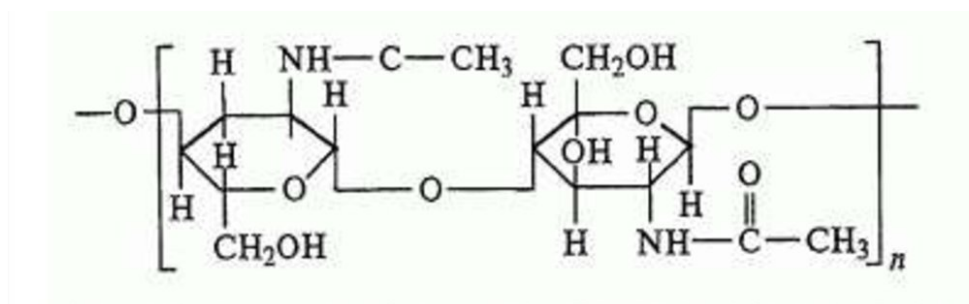


Рис. 5.4. Хитин

Особенность хитина состоит в том, что он не растворяется нигде: ни в щелочах, ни в органических растворителях самого разного вида. Как можно использовать его

промышленно? Его можно долго кипятить в кислой среде. Он будет медленно *деоциллироваться*, и в конечном счёте получится производная в виде *хитозана*. У него появляется *растворимость* в водных растворах, а также возможность *фракционировать по степени полимеризации* и богатая *химическая реактивность*. Хитозан задействуется для производства безопасных капсул и оболочек для лекарств. Кроме того, его добавляют для стабилизации в стиральные порошки и т.д.

Поверхностно активным химическим веществом является любое вещество, которое, оказавшись на границе раздела фазы, снижает поверхностное натяжение. В этом смысле *изопропанол* будет нормальным примером такого рода. Под **детергентами** понимают такие вещества твёрдой природы, которые при растворении образуют различные структуры (мицеллы или обратные мицеллы, трубочки, гексагональные упаковки и т.д.). Если посмотреть на фазовую диаграмму, она будет очень сложной, с большим количеством областей. Детергенты бывают:

1. **Нейтральные** - всякие производные, у которых есть *жирный хвост* и *полиэтиленоксидные участки*.
2. **Заряженные** - *анионные, катионные* и другие.

Наличие детергентов не очень хорошо для ферментов, взаимодействие с которыми может привести к *денатурации*. Чтобы защитить ферменты, можно использовать *полиэлектролиты*, например, добавлять *хитозан*.

Также нужно вспомнить про основной компонент хрящей - так называемый **протеогликановый агрегат**. Хрящ - это некая желеобразная связка, которая позволяет двигаться суставам. Из чего он построен? В центральной части - *гиалуроновая кислота* (рисунок 5.5.), далее небольшие *связующие* белки, затем *поровые* белки и нарастающие *гликозаминогликаны* (керотан-сульфат, андреатин-сульфат и т.д.). В результате мы получаем некий агрегат, у которого много *гидроксильных*, а также некоторых иных групп, хорошо связывающих *воду*.

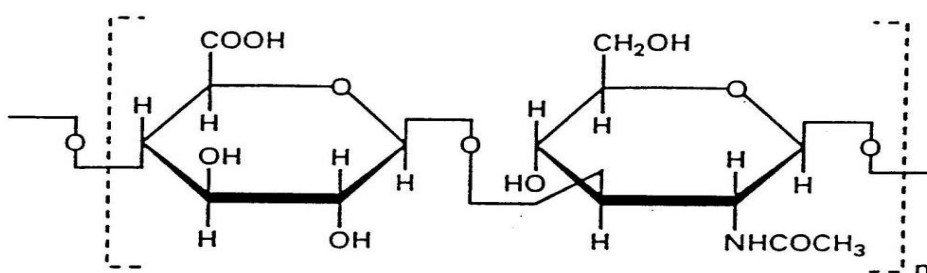


Рис. 5.5. Гиалуроновая кислота

Что можно отметить в отношении гликозаминогликанов? В их составе можно отметить *дисахаридный фрагмент*. В каждом из этих фрагментов один из остатков обязательно будет *производной глюкозамина*. Но при том, что вроде бы аминогруппа должна превращаться в *аммонийную* (быть положительно заряженной в нейтральных

средах), тем не менее, она модифицирована, и преобладают группы отрицательно заряженные (полианионы): *карбоксильная* и *сульфо-группы*.

Полисахариды бактерий

Бактерии, в отличии от клеток растений и животных, устроены таким образом, что у них очень *прочное окружение*. У животных клеток есть мембраны, у растительных - целлюлоза, и также строго всё у бактерий. У них есть **пептидогликан**. Его цепи очень похожи на гликозаминогликановые. Идёт цепочка *ацетилмурановой* кислоты. Но в ней присутствует модификация остатками олигопептидов. Они образуют “завязки”, образуя в итоге *пространственно замкнутую структуру* (слой), наслаивающуюся на следующую, и так далее. Это трёхмерная прочная сетка.

Бактерии бывают, в зависимости от того, дают они окраску или же нет, **грамположительными** и **грамотрицательными**. У первых пептидогликан имеет *30-40 слоёв* (в которых могут встречаться фрагменты нуклеиновых кислот и белков) и только *внутреннюю мембрану* (внешней нет), а у вторых - пептидогликан существенно тоньше (несколько слоёв), но при этом *две мембраны* (внутренняя и внешняя). Соответственно, они проявляют себя по-разному.

Пептидогликан подлежит ферментированию через **лизоцин**. Это небольшой белок, который специфичен к *углеводной* части (бактерицидные средства). А есть ферменты, которые расщепляют *олигосахаридные* фрагменты.

Прочие полисахариды

У растений есть и другие полисахариды. Например, **пектин** — производная *галактуроновой* кислоты (Рисунок 5.6.). На его основании можно готовить желе. Пектинами очень богаты ягоды.

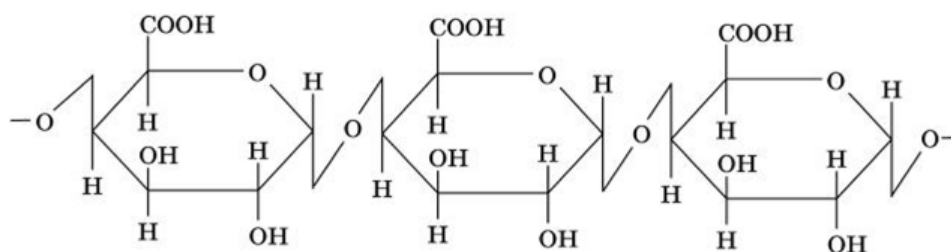


Рис. 5.6. Строение пектина

В принципе, зачастую хватает того кальция и магния, которые присутствуют в ягодах, чтобы делать вино, побочным продуктом которого был слой *геля*.

Ещё один полимер растений - **инулин** (Рисунок 5.7.). Его остатком является *фруктоза*. Его довольно много в топинамбуре.

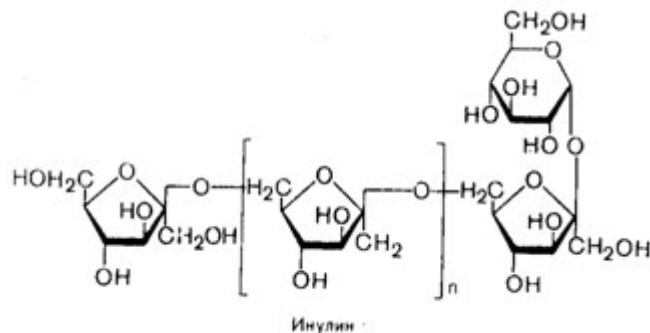


Рис. 5.7. Инулин

В водорослях также есть **агароза**. Мы видим, что она имеет производную *галактозы* в 4-м положении вверх, а также иной сахар. Агароза используется в качестве носителя в *хроматографии*.

Декстран - это хитро устроенный полимер, основная цепь которого построена в связке 1 и 6, а разветвления у него в звеньях 4 и 4.

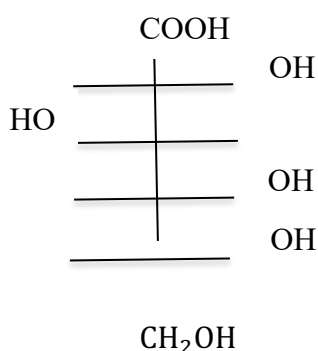
И наконец, **альгиновая кислота**. Она похожа на пектин, поскольку здесь имеются *маннуриновая* и *гиалуроновая* кислоты. В результате, эти кислоты могут быть как в растворимом, так и в нерастворимом виде. На её основе можно делать интересные конструкции для безопасной *транспортировки* лекарственных субстанций.

Лекция 6. Разбор задач. Продолжение темы аминокислот.

Разбор задачи №1

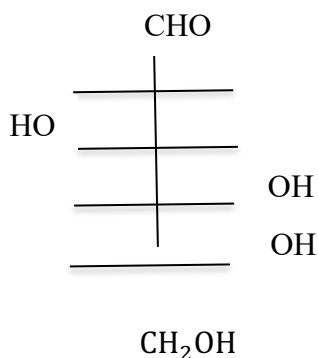
Разберём задачу: эквимольная смесь производных D-глюкозы А, В, С, D имеет состав $C_nH_{2n}O_n$ (раст.). То есть это производная моносахаридов. В то же время, ни одной из них данной формулой не описывается. Превращение D-глюкозы в каждом соединении протекает без изменения атомов углерода. Нужно определить, чему равно n в составе каждой смеси. По итогу, $n = 6$.

1) Изобразить А в проекции Фишера:



2) Записать молекулярную формулу В:

Вначале надо обозначить формулу А: $C_6H_{12}O_6$. Тогда формула В примет следующий вид: $C_6H_{12}O_5$. В - это 2-дизоксиглюкоза.



3) В соединениях С и D нужно было обратить внимание на другое: окисление с получением *альдаровой дикарбоновой кислоты*, которая выходит на второе место. Но окисление 6-й группы не проходит по условию.

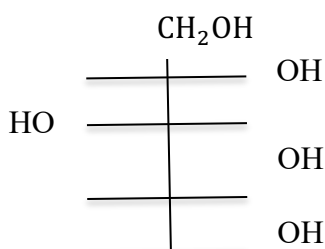
4) Приведите молекулярные формулы С и D:

Раз ничего нельзя делать с углеродом и кислородом, остаётся работать с *водородом*.

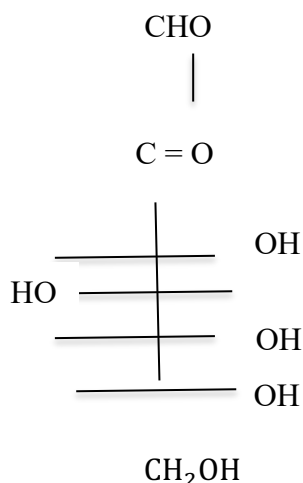
С будет иметь вид: $C_6H_{10}O_6$. Тогда D будет иметь вид: $C_6H_{14}O_6$.

Попутно заметим, что окисление может идти двумя путями в органических соединениях: во-первых, может быть *включение атома кислорода*, во-вторых, *отъём атома водорода*.

Теперь давайте изобразим *сорбит*: это явно будет D.



Ну а C-соединение будет таким: *дикарбонильным*.



Последний вопрос: какие из соединений могут существовать в *циклической* форме?

Соединение А может циклизоваться. Но под циклизацией можно также понимать продукт циклической формы. При переходе в циклическую форму глюкоза не выделяет воду. А лактон - да. Лактонизация - это образование внутреннего сложного эфира, с образованием воды. И да, и нет - верно. Соединение В может циклизоваться. Соединение С может циклизоваться разными способами (4 способа), с образованием и фуранозы, и пиранозы. Соединение D не допускает циклическую форму.

Процесс **гликолиза** в организме протекает *ферментативно*: соответственно, есть 10 стадий и 10 ферментов. Как работает фермент? У него есть активный центр. Субстрат

связывается и ориентируется правильным образом, а дальше каталитические участки “атакуют” его, и проходит ускоренная реакция. Однако, связывание идёт не в тех участках, где должна пройти реакция, а в других.

Попутно хочется разобрать ещё один вопрос. Почему из маннозы получается маннит, из рибозы получается рибит, а из *глюкозы* - *сорбит*? Это имеет отношение к проекции Фишера.

Разбор задачи №2

Задача вторая иллюстрирует то, как можно использовать *реакцию алкилирования*, чтобы установить, какие гидроксилы задействованы для связи между остатками моносахаридов в олигосахариде.

Мы имеем природный трисахарид X, состоящий из последовательно (слева направо): А-В-С. Две гидроксильных группы В задействованы для связи. X имеет молекулярную массу 504. При подсчёте массы надо учитывать расход воды. $504 + 36 = 540 / 30 (CH_2O) = 18$.

Трисахарид обработали *йодистым метилом*. Полученное подвергли гидролизу в жёстких и мягких условиях. Были получены продукты: *тетраметил* (в жёстких условиях), *тетраметил производная-С* и *метилованный дисахарид У* (в мягких).

1) Определите число атомов углерода в моносахаридах А, В и С.

У нас возможности от 3 до 7 атомов. а) **6:6:6**; б) 6:5:7; в) 4:7:7.

В результате гидролиза выяснилось, что С полностью идентичен одному из продуктов *гидролиза сахарозы*. Мы знаем, что сахароза в сочетании с водой дают *глюкозу* и *фруктозу*. В любом случае, у нас есть одна шестёрка. Кроме того, в условии сказано, что в слабощелочной среде В и С превращаются друг в друга. Соответственно, варианты б) и в) отпадают.

Итак, что происходит в жёстких условиях:

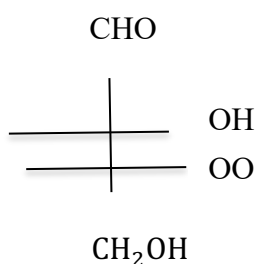
	2,3,4,6	2,3,4	1,3,4,6
А в <u>мягких условиях</u> ?	А	В	С
у = А-В. На связь идёт:	1	1,6	2
Получаем:	?	Glc	Fru

Для идентификации В, был проведён синтез Килиани-Фишера с последующим окислением продуктов азотной кислотой. В результате были получены две оптически активные и одна оптически неактивная 7-углеродные дикарбоновые кислоты. С - это фруктоза.

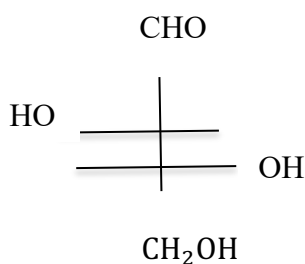
Манноза получается при наращивании продукта. Два варианта, оба из которых не годятся. Проверяем глюкозу. Из неё получается два продукта, один из которых оптически активен, а другой - нет. Значит, В - это глюкоза (а не манноза).

И в этой ситуации скорее всего на связь с фруктозой идёт *первый* атом. Окисление *А* концентрированной азотной кислотой привело к оптически неактивной дикарбоновой кислоте *Ф*. Моносахарид *А* может быть получен *двумя* последовательными повторами реакции Килиани-Фишера, если исходным соединением выступает *треоза*. Что такое триоза?

Сколько у нас существует *альдотетроз*? Две:



Мы имеем *D-эритрозу*. А теперь вторая:



Тогда мы имеем *D-треозу*.

Треоза - это углевод, в котором *четыре атома углерода*. Мы из *треозы* приходим к паре соединений, которая также разветвляется на пары. Оптически неактивной является только один моносахарид из 4-х вариантов: *А* - это *галактоза*.

Итак, у нас есть *глюкоза* с 1,6 связями. Далее у нас *фруктоза* в бета-фуранозной форме. И наконец *галактоза*, где в аксиальном положении будет β -форма.

Классификация аминокислот

Мы разобрались, говоря об *аминокислотах*, что есть с точностью до бокового заместителя, *две ионогенных группы*. Мы увидели, что происходит с ними. Вспомнили кислоты, а также уравнение Хендерсона. Мы рассмотрели, какие есть области в зависимости от заряженности рН. Основной наш интерес лежит в области нейтральных значений, и там свободная аминокислота пребывает в цвиттер-ионной форме.

Далее мы вспомнили про стереохимию и пришли к выводу, что *D, L* и *R, S* - это разные шкалы измерения.

И наконец, мы рассмотрели, что белки бывают двух основных видов: глобулярные (эллипсоидные) и фибриллярные (нитевидные).

Основные функции белков:

- 1) ферментативная
- 2) транспортная
- 3) защитная
- 4) строительная
- 5) двигательная
- 6) связки и хрящи
- 7) гистонная
- 8) и т.д.

Мы разобрали 20 (вообще их 22) канонические аминокислоты. Их классификация предполагает деление на два основных вида:

1. Неолярные:

1.1. **Алифатические:** *Ala* (аланин); *Val* (валин); *Leu* (лейцин); *Ile* (изолейцин).

1.2. **Ароматические:** *Phe* (фенилаланин); *Tyr* (тирозин); *Trp* (триптофан).

2. Полярные:

Если мы говорим о заряженности, мы должны указать **pH = 7**.

2.2. **Заряженные положительно:** *Lys* (лизин); *Arg* (аргинин); *His* (гистидин).

Аминогруппа лизина имеет знак ϵ (эпсилон). Группа аргинина называется *гуанидиновая*. Лизин имеет pK 9-10. Аргинин имеет pK 10-12. pK гистидина может меняться в диапазоне 6-8 (можно отнести в незаряженные).

2.2. **Незаряженные:** *Asp* (аспарагиновая кислота); *Glu* (глутамин);

Аспарагиновая кислота имеет pK в диапазоне 2,5-5. Глутамин тоже имеет pK в диапазоне 2,5-5 (в зависимости от окружения).

2.3. **Заряженные отрицательно:** *Asn* (аспарагин); *Gln* (глутамин); *Cys* (цистеин);

Чтобы запротонировать амидные амины, нужно создать очень кислую среду. Аспарагин имеет pK в районе 1. Глутамин имеет pK в районе 1. Цистеин имеет pK 8-8,5 (в цистеине есть сильно реакционная SH-группа, при 7 какая-то часть будет заряженной).

Первый тип реакции: сульфиды обладают крайне *низкой растворимостью*. Если *SH-группа* начинает связываться с тяжёлыми металлами, получается испорченный белок.

Второй тип реакции: нуклеофил может вступать в различные реакции *нуклеофильного замещения*. При переходе на первичную структуру белков мы обнаружим, что там очень много *карбонильных углеводов*. Соответственно, это дельта+. Всё это может приводить к неконтролируемому гидролизу полипептидной цепочки.

Третий тип реакции - *окислительно восстановительный*. Могут быть разные степени окисления. Если до конца провести окисление, то будет сульфо-группа. В качестве защиты получается промежуточная стадия: *дисульфидный мостик* (со степенью окисления 0) => окислительно-восстановительная реакция. Если дорисовать углеродный остов, то два остатка цистеина, образовавшие мостик - это *цистин*.

Последнее, что надо сказать: SH-группы в свободных белках практически не встречаются. Обычно, они присутствуют *в составе дисульфидного мостика*, либо в *активном центре* (при определённой контролируемой среды).



Лекция 7. Уровни структурной организации белков. Часть первая.

Мы попробуем закончить рассмотрение *боковых заместителей* альфа-аминокислот. Мы решили классифицировать аминокислоты по свойствам боковых заместителей. Мы решили также рассматривать только *канонические аминокислоты* эукариот. Мы выделили **20 аминокислот**, разбив их на 2 основные группы. Среди неполярных мы записали 4 алейфатических, затем три ароматических аминокислоты, отметив, что у *тирозина* и *триптофана* есть определённые сайты полярности при их общей неполярности. Также мы обратили внимание, что такие массивные боковые заместители отделены от основной группы метиленовыми заместителями.

Затем мы перешли к полярным аминокислотам, разбив их на три группы по заряженности, попутно заметив, что **заряженность** - это не абсолютное свойство ионогенной группы, но зависит в первую очередь *от условий рН среды*. И соответственно, мы прошли положительно заряженные аминокислоты.

С *гистидином* ситуация оказалась немного сложнее, потому что у имидазольного кольца рК 7 (нейтральные среды), поэтому его можно относить и к положительно заряженным, и к нейтральным. Далее мы обзрели две *отрицательно заряженные* аминокислоты (*аспарагиновая* и *глутаминовая* кислоты) и перебрались на *незаряженные*.

В первую очередь мы рассмотрели амиды только что указанных кислот и обсудили, насколько различаются *аминные* и *амидные* группы. После этого мы посмотрели на две серосодержащих аминокислоты, вспомнив про *сульфиды* тяжёлых металлов и про реакцию *нуклеофильного замещения*.

Подытожили мы тем, что в белках мы не ожидаем найти много свободного *цистеина*, потому что высок риск испортить белки. Соответственно, либо это *дисульфидные мостики*, либо *активные центры* (в специальной среде).

Остаток классификации аминокислот

Нам необходимо довести нашу классификацию аминокислот до содержательной полноты. Итак, у нас остались:

- *Ser* (сирин)
- *Thr* (треонин)

рК у спиртовых групп - ближе к 16. Говорить о присутствии алкоголята в белках просто нельзя. Также здесь стоит обсудить вот что: каково рК у воды? На примере воды, когда мы говорим о рК, то это $-\log$ равновесия. В случае воды это $H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$. Электролитическая диссоциация. Теперь вспоминаем график и то, что **рК** - это такое значение рН, при котором концентрация протонированной и депротонированной форм равны. Тогда рК воды будет где-то 15,7.

Остались два исключения:

1. *Gly* (глицин).

Это единственная из канонических аминокислот, у которой альфа-углеродный атом не является асимметрическим, потому что присутствуют *два водородных заместителя*. У нас не может быть L или D-глицина. Боковой заместитель крайне *мал* и не создаёт никаких стерических затруднений. Это элемент аномальной *гибкости*. Там, где полипептидная цепочка делает поворот, с вероятности $\frac{1}{2}$ там будет глицин, потому что там нет стерических затруднений. Глицина не может быть слишком много в *глобулярных* белках (это бы вызвало излишнюю подвижность):

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

Чем подвижнее цепочка, тем при её сворачивании будет серьёзнее *энтропийный* проигрыш. В то же время, *фибриллярных* белках глицина может быть довольно много. В частности, есть белок *бета-фибраллин* шёлка. В макросвойствах шёлка проявляется микросвойство эластичности белковой цепочки.

2. *Pro* (пролин).

Это единственная аминокислота, для которой целесообразно изобразить полную структуру, а не только боковой заместитель (Рисунок 7.1.). Цикл называется *пролин*, и при внимательном осмотре выясняется, что это никакая не аминокислота, а *аминокислота*. Для пролина характерна, в противоположность глицину, повышенная *жесткость* полипептидной цепочки. Поэтому пролина в глобулярных белках тоже довольно мало. Там, где полипептидная цепочка делает поворот, с вероятности $\frac{1}{2}$ там будет пролин.



Рис. 7.1. Пролин

В глобулярных белках средняя молекулярная масса кислотного остатка - 110. У глицина - 57. У триптофана - 190. Если нам говорят, к примеру, что белок состоит примерно из 300 кислотных остатков, то мы можем быстро посчитать его приблизительную массу. И наоборот, по массе мы можем узнать примерное количество кислотных остатков.

Теперь ближайший наш интерес будет направлен на базовые уровни структурной организации белков:

1. **Первичная** структура

2. Вторичная структура
3. Третичная структура
4. Четвертичная структура

Специальная классификация задействует 6-уровневую структуру. Но это условное добавление, о котором надо, однако, иметь представление:

1. Первичная структура
2. Вторичная структура
3. Сверхвторичная структура
4. Структурные домены
5. Глобулярный уровень
6. Олигомерные белки

Первичная структура белка

Первичная структура — это последовательность аминокислотных остатков, соединённых пептидными связями (при потере воды). Хочу сразу обратить внимание на три момента:

- 1) Пептидная структура подразумевает *ковалентные* связи.
- 2) С точки зрения расположения в пространстве - это некая *абстрактная* запись.
- 3) Структура первого порядка однозначно *определяет* структуры *более высокого* уровня (другое дело, что мы не можем предсказать форму высокого порядка, просто посмотрев на первичную форму).

Давайте запишем *самый простой* полипептид. Это **дипептид**.

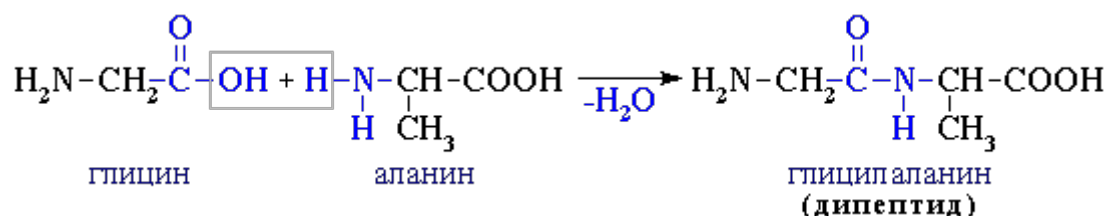


Рис. 7.2. Образование дипептида

Амидная связь становится *пептидной*, когда с обеих сторон есть пептидные остатки. Это проявляется в свойствах ферментов (*протеазы* и *пептидазы*). У них очень высокая *субстратная специфичность*, с точки зрения связей, которые они обеспечивают. Что им нужно для гидролиза? Дельта+ на карбонильном углероде.

В какую сторону сдвинуто равновесие этой реакции? *Сильно влево*.

$$\Delta G^\sigma = 22 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$$

Надо сказать, что вся биохимия построена на калориях, но это несистемная единица. Поэтому в Си принято обозначать килоджоули (домноживая на 4,2). Соответственно, в калориях это 5. В указанной реакции важно то, что **ферменты** - это биологические катализаторы, а любой катализатор в равной степени ускоряет прямую и обратную реакции, не влияя на положение термодинамического равновесия. Это означает, что мы не можем объяснить “сдвиг” *влево* ферментным влиянием.

У живых организмов постоянно происходит белковый синтез на рибосомах внутри клетки. В клетке есть *цитозоль* (водный раствор). В этой водной среде постоянно образуются пептидные связи. Почему? В организме практически нет *кинетически контролируемых* синтезов (когда при сложной реакции происходит разложение продукта). Работает правило: **если процесс термодинамически не выгоден, а на практике всё же наблюдается, значит есть сопряжённые процессы, которые и поставляют энергию.**

Иными словами, речь идёт о гидролизе АТФ: пептидная связь образуется за счёт энергии, накопленной в АТФ. Ведь практически любой анаболический процесс в организме протекает за счёт энергетических затрат (которые поставляются с едой, но хранятся в АТФ). Соответственно, на производство одной пептидной связи расходуется примерно 4 молекулы АТФ.

При этом $\Delta G^\sigma = -31 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$. По идее, даже одного эквивалента связи молекулы АТФ хватило бы для того, чтобы сделать молекулу пептидного белка (компенсировать энергетические потери). Однако, тратится четыре. Почему? Во-первых, это **стандартное условие**, подразумевающее одномолярные стартовые концентрации всех участников реакции, а во-вторых, происходят **сложные процессы** на рибосоме, и значительная часть энергии уходит на *необратимость* (и некоторая часть идёт на проверку кадонового и антикадонового взаимодействия).

Попутно заметим, что образование пептидной связи предполагает, что ΔG является для неё *слабо-положительной* величиной. Это говорит о том, что организм расходует энергию оптимально, не затрачивая лишней доли.

Итак, мы синтезировали белок. Каков его срок жизни? Среднее значение: от 2 до 200 часов. При этом, белок *свернулся*, а пептидных связей очень много, и некоторые из них, что находятся на поверхности, будут контактировать с водой. Что с ними произойдёт? Они гидролизуются. Таким образом, мы имеем ещё одно правило: **если какой-то процесс является термодинамически выгодным, а на практике не наблюдается, значит процесс контролируется кинетикой.**

Пептидная связь защищена очень *высоким активационным барьером*. Значит, связи не распадаются раньше сигнала к распаду. Другой момент: происходит усвоение белковой пищи. Происходит разбор на аминокислоты с помощью этого барьера. При этом действуют *ферменты*, задача которых (с образованием фермент-субстратного комплекса) - разложить один барьер на несколько. В результате, в случае

многостадийного процесса, скорость такого разложения (V лимитирующая) определяется *высотой* самого высокого барьера.

Помимо *энергетических* особенностей, у пептидных связей есть также интересные *геометрические* особенности. Они связаны с тем, что, казалось бы, эта связь - *одинарная*:

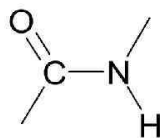


Рис. 7.3. Одинарная связь

Но на самом деле здесь есть существенный вклад *двойной* связи:

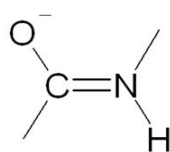


Рис. 7.3. Двойная связь

Это происходит благодаря *кетонольной таутомерии*. В результате получается, что вклад одинарной связи - 40%, а двойной связи - 60%. Это определяется по длине связи (при линейности). Но все пептидные связи имеют *одинаковую* длину и занимают *промежуточные* значения.

Из этого всего следует, что связь становится *плоскостной*. Соответственно, возникает *заторможенность вращения*, а также **цис-транс-изомерия** (что присуще двойной связи). В подавляющих случаях в белках пептидные связи пребывают в транс-изомерной форме. Между *цис*- и *транс*-формами очень небольшие энергетические различия, всего порядка $9 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$. Транс-форма при этом защищена большим барьером, поэтому взаимных переходов между формами в белках не происходит. В связи с чем возникает транс-форма? В первую очередь, в силу *стерических затруднений*.

Есть одна аминокислота, для которой равно возможны *цис*- и *транс*-формы. Это *пролин*. У него настолько жёсткое кольцо, что различие несущественно. У него соотношение примерно 50/50. Но белки так интересно построены, что остаток пролина должен быть *либо* в *цис*-, *либо* в *транс*-форме.

Теперь нарисуем **трипептид**.

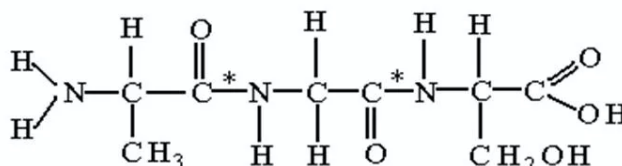


Рис. 7.4. Трипептид

Если посмотреть на эту цепочку, обнаружится, что её концы не идентичны: с одной стороны - *аммонийная* группа (N-конец), а с другой - *карбоксильная* группа (C-конец). Хотя в таких формулах, хоть в трёхбуквенных кодах: 1) n-конец всегда слева, и 2) нумерация ведётся слева направо.

Теперь к **картам Рамачандрана**. Это известный индийский специалист по белкам. Он не получил Нобелевскую премию, но внёс очень большой вклад в исследование структур белков. Он использовал модели жёстких сфер для предсказания структуры белков.

Что такое полипептид? Две *плоскости*, а между ними углеродный атом. Это довольно *жёсткая структура*. Всё, что остаётся для возможности сворачивания - это повернуться вокруг *двугранных (торсионных) углов* (φ и ψ , предшествующих углеродному атому). Белок можно сравнить с *проволокой*. Так вот, Рамачандран придумал интересный способ построения графика ($\varphi; \psi$) на плоскости, где будет откладываться от -180 до +180 градусов. Каждый раз при нахождении пары φ / ψ ставится точка.

Будет видно, *какие двугранные углы возможны* для этого белка, а какие нет. А также *какая доля всей поверхности возможна*. Карта Рамачандрана работает как для одного белка, так и для белковых групп (Рисунок 7.5.).

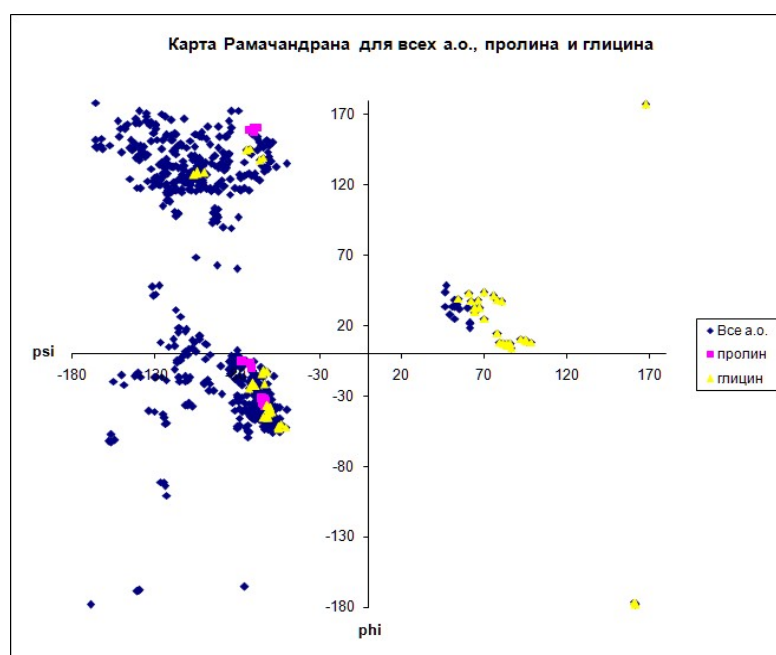


Рис. 7.5. Карты Рамачандрана

Есть две аминокислоты - исключения: *пролин* и *глицин*. Для глицина возможна существенно *большая* поверхность. Для пролина возможен лишь *малый* кусочек поверхности. Что мы будем считать углом **0:0**? Если посмотреть на цепочку, это будет набор плоскостей. Если мы выровняем их все, то все заместители будут в одной плоскости. Это и будет 0:0.

Чаще картами пользуются для *конкретных* белков. Находят полипептидные остатки, которые выбиваются из каких-то хороших областей и придумывают *точечную замену*, чтобы это напряжение снять. Потому что бывает так, что надо создать напряжённую конфигурацию, но образовался солевой мостик: чтобы она получилась, нужно перетягивать цепочку.

В принципе есть три способа рассмотрения структуры белка:

1. **Вырастить кристалл.** Но *не из всех белков* растут кристаллы. Кроме того, если мы говорим о функциональном белке, то он работает в *растворённом* виде (а не в виде кристалла), и у него есть так называемая *конформационная подвижность*. Поэтому кристалл белка используется не всегда.
2. **Метод ЯМР.** Всё начиналось с маленьких белков, но постепенно размер белков увеличивался. В частности, это происходит потому, что становятся доступны всё более мощные приборы и компьютеры. Но у ЯМР есть другая проблема. Что нужно, чтобы снять спектр? Нужно накапливать сигнал (занимает время). Соответственно, белок всё время дышит. Поэтому есть ещё один метод, который становится всё более популярным сегодня и помогает увидеть не структуру в целом, но скорее наиболее важные её участки.
3. **Создание антител** против отдельных частей белка (через **иммунные комплексы** смотреть, где идут какие связывания). Это эффективно при наличии лабораторных возможностей для выработки антител.

При этом стоит сказать, что и **моделирование** полезно, но оно *не может быть единственным* методом. Обычно работает некая совокупность методов.

То же касается и **спектральных** методов, которые позволяют получить *усреднённую* информацию (но это будут не более чем указания, которые нужно подтвердить с использованием отдельных методов). Принято считать, что если несколько разных методов дают расходящиеся результаты, то это практически доказано. Здесь мы идём как бы от противного. По большому счёту, доказательство – это очень затратное и скрупулёзное дело. Всегда могут оставаться сомнения в том, а является то или иное положение дел доказанным. Поэтому на практике остаётся перебирать альтернативы и фальсифицировать их.

Дело в том, что **нельзя доказать механизм химической реакции, но можно опровергнуть альтернативные**.

Поэтому сейчас основная проблема кроется в другом аспекте: то, что мы хорошо видим на уровне атомов, очень *трудно видеть в динамике*, да ещё *в высоком разрешении*. Это дело прогресса технологий, которые могут облегчить наблюдение на микроуровне и прояснить многие спорные вопросы.

Лекция 8. Уровни структурной организации белков. Часть вторая.

Мы начали рассмотрение структурной организации белков. Начали рассмотрение первичной структуры. Отметим, что это уровень, который базируется на *ковалентных* пептидных связях. Мы пришли к пониманию, что с точки зрения записи, первичная структура - это *абстракция*. И наконец, мы установили, что первичная структура *предопределяет* дальнейшее разворачивание белка.

Теперь следует перейти к структурам более высоких уровней. Надо отметить, что эти структуры существуют благодаря *нековалентным (невалентным)* взаимодействиям. С другой стороны, это структуры, реально существующие в пространстве (их можно рассмотреть с помощью мощного микроскопа).

Невалентные взаимодействия

Перед тем, как мы начнём обсуждать вторичные структуры, надо разобраться с *невалентными* связями. Выделяют четыре типа невалентных взаимодействий:

1. Дисперсионные силы притяжения и отталкивания электронных оболочек.

Давайте представим себе *изолированный атом* в вакууме. Что он представляет из себя с точки зрения распределения его электронной плотности во времени? Вероятность для него встретить электрон (во времени) в каждой точке пространства *изменяется*. Это значит, что он представляет из себя *осциллирующий диполь*. Представим теперь, что два атома осциллируют друг друга, *не оказывают* никакого взаимного *влияния*. Но по мере сближения они начинают наводить друг друга (“+” одного смотрит на “-” другого) и *притягиваться* по закону Кулона. Заметим, что это далёкие *электростатические* взаимодействия.

Как рассматриваются заряды в электростатике? Точечно. Возникает притяжение, и они поворачиваются друг к другу одноимённо заряженными электронными оболочками. Возникает отталкивание. В конечном счёте, возникает **равнодействующий потенциал**:

$$U = \frac{A}{r^6} - \frac{B}{r^{12}} \text{ при } r \text{ (опт.)} = 4,5 \div 5 \text{ ангстрем. Соответственно, } \Delta G = -0,12 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}.$$

Однако обратите внимание, что мы не накладывали никаких ограничений на атомы. По идее, это может возникать между любыми атомами (в разной степени). И когда мы говорим о свёрнутом белке или какой-то другой биомолекуле, очень многие атомы оказываются где-то в районе этого *оптимального расстояния*, и надо учитывать эти взаимодействия.

2. Электростатические взаимодействия между постоянными зарядами.

Заряды могут быть *целочисленные* (например, остаток аспартата и лизина), либо *частичные* (например, кислород карбонильной группы). Поэтому, соответственно, они описываются законом Кулона:

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \cdot \frac{q_1q_2}{r^2}$$

Вид записи зависит от системы единиц измерения. И здесь важно всё:

- важен *знак заряда* (отношение знаков): если знаки разноимённые - *отталкивание*, если одноимённые - *притяжение*;
- важна величина заряда: целочисленный или дробный (меньше 1, равен 1, или больше 1) => чем *больше* заряд, тем *сильнее* взаимодействие
- важен r^2 в знаменателе: электростатические взаимодействия очень чувствительны к расстоянию (с увеличением расстояния, убывает сила взаимодействия);
- важна ϵ (диэлектрическая постоянная среды).

В вакууме $\epsilon = 1$ (нулевое); для C8H18 (октан) $\epsilon = 2$; для H2O $\epsilon = 81$; для спиртов (растворимых в воде) $\epsilon = 15-25$; для внутренней области белка (P) $\epsilon = \sim 4$. Внутри белка всё упаковано очень плотно (практически как в кристалле). А где будет выше электростатическое взаимодействие, внутри белка или на поверхности? *Внутри*. Соответственно, если мы говорим об электростатических взаимодействиях между группами белка, то мы имеем в виду то, что происходит *внутри* белка.

Какой может быть источник *положительного* заряда? Лизин, аргенин, гистидин. А ещё? *N-конец*. Он может быть и модифицирован. Какой может быть источник *отрицательного* заряда? *Asp, Glu* и *C-конец*. В белке также очень *мало* солевых мостиков (1-2 на 300 кислотных остатков). Почему?

К примеру, аспаратат оказывается между двумя неполярными заместителями, и белок пытается втянуть его внутрь. Если это произойдёт, то заряд окажется в среде *октана*. Организм нашёл выход: плюс подтягивается к минусу, и получается солевой мостик. То есть, ионная пара и солевой мостик компенсируют заряды друг друга, образуя неполярный продукт.

А если теперь посмотреть на солевой мостик и сравнить это с ситуацией его *отсутствия*? Будет где-то в районе $-22 \frac{\text{кДж}}{\text{моль}}$. Можно сравнить тетрамер в *обычной* среде и точно такой же тетрамер, существующий при *повышенной* температуре (термофилы). Разница только в наличии 4-х солевых мостиках. Иными словами, *солевой мостик* - это хорошая дополнительная *завязка*. И каждый солевой мостик, который образовался, опускает энергию на 22 кДж/моль.

А теперь предыдущий момент: если оставить *нескомпенсированный* заряд, то это ситуация, в которой, по сравнению с *отсутствием* заряда, они будут иметь разницу порядка 40 кДж/моль.

Мы говорили о притяжении. Но надо иметь представление и об **отталкивании**. Как мы выяснили, в белке очень много пептидных групп, и когда белок сворачивается, не все они отдаляются друг от друга. Очень часто *два кислорода*, принадлежащие разным карбонильным группам, оказываются *близко* друг к другу. Тогда возникает *отталкивание* (где-то порядка + 1,5 кДж/моль).

3. Водородные связи.

Рассмотрим образование водородных связей на простом примере: *вода* (H_2O).

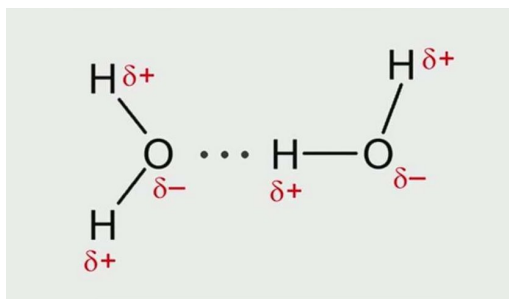


Рис. 8.1. Образование водородных связей

Почему водородные связи выделяются в *отдельную группу* электростатических взаимодействий? У водорода есть что-то, что *отличает* его от всех остальных элементов. Это присутствие всего *одного электрона*. А где этот электрон? Он смещён в составе ионной пары в сторону того кислорода, с которым водород связан ковалентно. Получается, что на месте многоточия (Рисунок 8.1.) *нет больше электронов*, которые могли бы отдать ковалентные связи (и мог бы отталкивать). В результате, когда на этом месте оказывается *электроотрицательный* атом, происходит *укорачивание* связи.

Если говорить об электростатических взаимодействиях, то длина связи в первом приближении будет равна сумме вандерваальсовых радиусов. А в данном случае происходит *укорачивание* на 10-25% (они сближаются) за счёт того, что *нет возможности отталкивания* электронов. **Чем больше укорачивание, тем прочнее будет связь.** Когда у нас есть ОН и О, укорачивание будет порядка 25%. А самое слабое укорачивание будет в случае NH и серы. Азот занимает промежуточное положение.

При H_2O (жидк.) ΔG^0 = порядка -3 кКал/моль. При H_2O (твёрд.) ΔG^0 = порядка -4 кКал/моль. В белке ΔG^0 = порядка -3 кКал/моль. Мы видели *солевой мостик*: он между целочисленными зарядами, и там около $\Delta G^0 = -5$ кКал/моль. Это, конечно, больше, но солевых мостиков гораздо меньше, чем водорода в белках => Совокупный вклад по поддержанию структуры от водородных связей гораздо более существенен.

Стоит сказать также, что максимально энергетически-выгодной ситуацией будет *линейное расположение* всех атомов. В других случаях водородная связь будет менее выгодной.

4. Гидрофобные взаимодействия.

В начале их обсуждения можно задаться вопросом о том, вода боится чего-то, или что-то боится воды? Если брать более полный фрагмент воды, где молекул много, то ясно, что вода участвует *во множестве связей*. В каком максимальном количестве водородных связей? *Четырёх*. По одной на каждый *водород*, и две - на *кислород*. Эта ситуация реализуется в *твёрдом* состоянии воды.

А если говорить о *жидком* состоянии? В ней 3,6 водородных связи на одну молекулу (в среднем). Но как понять, что вода жидкая? Всё дело в том, что каждая из этих связей очень мало живёт (порядка 10^{-5} сек.). А далее она разрывается, и молекула может обзавестись новыми “соседями”. И так далее. Но в любой момент времени, при пересчёте, количество связей, поделённое на количество молекул, будет равняться 3,6. Такие системы называются **динамически равновесными**.

Динамически равновесные системы достаточно широко распространены в природе. *Мицеллы* - это другой пример такой системы. Мицелла состоит из *полярной головы* и *неполярного хвоста* (бифильная молекула). Так вот, в водной среде, благодаря **гидрофобным взаимодействиям**, “хвосты” пытаются спрятаться *внутри* (чтобы не контактировать с водой), а “головы” смотрят *наружу*. Получается *сфера* (например, *додецилсульфат натрия*).

Что ещё важно? Мицелла образуется выше некоторой критической концентрации. Если концентрация вещества ниже, то оно будет просто плавать в водной среде. Мицеллы постоянно сталкиваются, и вещество может переходить от одной мицеллы к другой через раствор. Соответственно, это такие же **динамически равновесные системы**.

Итак, возвращаемся к воде. Вода - это трёхмерная сетка водородных связей, очень *энергетически выгодных*. Однако, при попадании неполярных веществ, ситуация ухудшается довольно резко. Предположим, это всё же произошло. Что тогда будет? Неполярная часть будет стремиться к воздуху, если поверхность раздела достижима. А теперь поставим ограничение: она недостижима. Допустим, есть белок, из которого в воду торчит остаток *изолейцина*. Это *энергетически убыточная* ситуация.

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

В данном случае процессов со снижением дельта G скорее всего не будет. Наоборот, есть два варианта:

- 1) вода остаётся жидкой, при этом теряется часть водородных связей, и растёт *энтальпия*, а *энтропия* практически постоянна ($H \uparrow$; $S \cong const$);

- 2) вокруг неполярной молекулы создаётся небольшая оболочка льда (*клатратная вода*), и *энтропия* падает (мы переходим к более упорядоченной системе), но за счёт того, что в твёрдой среде водородных связей больше, *энтальпия* остаётся практически неизменной ($H \cong const; S \downarrow$).

Надо подчеркнуть, что и тот, и другой случай - энергетический проигрыш. Но что выберет природа? Меньшее из зол. Меньший убыток оказывается в случае *клатратной воды*. Если мы не будем замораживать воду, мы потеряем больше энергии.

Теперь представим, что неподалёку оказались два неполярных фрагмента, каждый из которых окружён льдоподобной структурой. (Здесь надо вспомнить, что **аддитивная величина** — это складывающаяся величина). Эти структуры *не являются аддитивными*. Если у нас слипнутся два неполярных фрагмента, то нам потребуется меньше молекул воды, чтобы окружить их общей клатратной оболочкой. Тогда часть молекул воды разморозится и выйдет в объём растворителя. Принято считать, что **движущей силой гидрофобных взаимодействий является выигрыш в энтропии растворителя**.

Здесь есть два дискуссионных момента. *Во-первых*, это будет выигрыш, если мы в качестве системы отсчёта возьмём приведённую ситуацию. Но в ситуации, когда была просто вода, то мы частично отыграем проигранное. *Во-вторых*, принято считать, что это выигрыш в растворителе. И действительно, вода размораживается, и упорядоченность системы падает. Но при этом вода встраивается в систему водородных связей (а значит, есть и энтропийный фактор).

Важно различать **гидрофобную связь** (имеющую *направленность* двух сторон) и **гидрофобное взаимодействие** (где такой *направленности нет*).

Возвращаясь к вопросу, кто же кого “боится” (*фобия* - страх), можно предположить, что неприятель взаимная: *воде* не надо ничего *неполярного*, а *неполярному* не надо *воды*.

Вторичные структуры белка

Вторичная структура - это способ укладки полипептидной цепи в пространстве, реализующийся благодаря водородным связям между СО и NH группами полипептидного остова. Речь идёт о *реально* существующей геометрии. При этом вклад боковых заместителей второстепенен.

Виды вторичных структур:

1. Спирали
2. Складчатые листы

Напомню, что мы говорим о *глобулярных* белках. Поговорим вначале о спиральных. Представьте себе пептидную связь СО-NH. Речь не идёт о том, что это одна и та же водородная связь. Углы расположены таким образом, что эти группы смотрят в разные

стороны. Чтобы она реализовалась, надо, чтобы прошло *несколько аминокислотных остатков*.

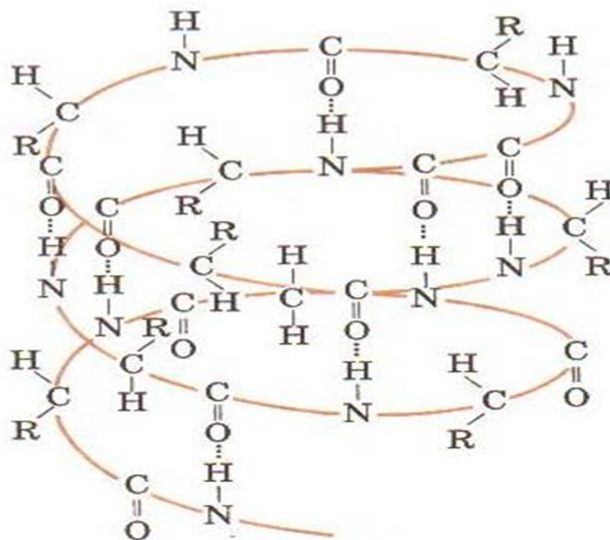


Рис. 8.2. Спираль

Чаще всего выделяются три типа спиралей (Рисунок 8.3: слева направо). Они различаются по *количеству аминокислотных остатков* между водородной связью:

1. **3_{10} -спираль** ($i, i+3$)
2. **α -спираль** ($i, i+4$)
3. **π -спираль** ($i, i+5$)

Речь идёт о различии в количестве остатков на один виток. В *три-десять спирали* будет 3 остатка на виток, в случае *альфа-спирали* - 3,6 остатка на виток, в случае *пи-спирали* - 3,6 остатка на виток. Стоит сказать, что альфа-спираль является самой распространённой (в 99/100 случаев встречающаяся в глобулярном белке спираль будет альфа). Соответственно, у альфа-спирали есть что-то, что делает её *более стабильной*.

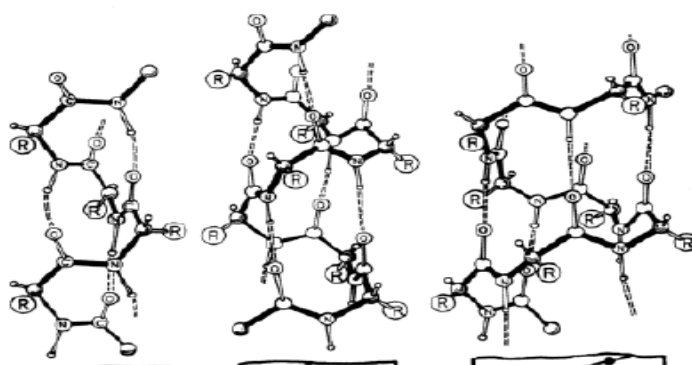


Рис. 8.3. Типы спиралей

В связи с этим можно выделить три причины стабильности α -спирали:

- 1) *линейность водородных связей* (большая энергетическая выгодность);
- 2) *отсутствие стерических затруднений* от боковых заместителей;
- 3) диаметр спирали (для альфа-спирали это 4,5 ангстрема, то есть оптимальное расстояние для дисперсионных сил притяжения).

В **три-десять спирали** группы CO и NH оказываются *друг под другом*, но при этом не получается линейной связи. В случае **альфа-спирали** ось спирали и линия, проходящая через линейную связь, будут *скреживающимися* кривыми (CO существенно *более линейна* по отношению к NH).

Альфа-спираль видели много где, а *три-десять спираль* встречалась обычно в скрученных завязках по концам альфа-спирали. *Пи-спираль* не находили, но расчёты показывали, что ей соответствует минимум потенциальной поверхности (что говорит о том, что если бы она существовала, это была бы выгодная структура). То есть, цепочка может свернуться в пи-спираль. В настоящее время *найденны* объекты, в составе которых обнаружена пи-спираль.

Что ещё важно знать о спиральях? Альфа-спирали соответствует примерно -60/-60 на **карте Рамачандрана** (3-я четверть, слева внизу). Есть одна аминокислота, которая практически *несовместима* с альфа-спиралью — это *пролин* (не больше 2-х, иначе альфа-спираль обрывается). Здесь можно вспомнить, что в коллагене, с одной стороны, *много пролина*, но в то же время, коллаген *спирализован*. Дело в том, что *коллагеновые спирали* не имеют ничего общего с альфа-спиралью.

Интересно, что, используя *спирали*, очень легко показать, почему белки нашего мира построены из остатков L-аминокислот. Почему спирали в глобулярных белках - *правые*? Именно потому, что аминокислоты - *левые* (L). Почему нельзя делать белки на смеси с D-аминокислотами? В мире существует много таких остатков. Однако, белки могут строиться только на одном типе. Почему это L? **Эволюционная биохимия** предполагает, что это произошло по случайности. Если бы была возможна смесь, то мы бы не смогли сворачивать белки ни в одну, ни в другую сторону.

Напоследок надо ввести понятие **цилиндрической развёртки** (Рисунок 8.4.). Для *три-десять спирали* на прямой будет *три окрашенные точки* (одна под другой). Почему спираль называется *3/10*? Потому, что полная система повторяемости с водородными связями получается при *трёх остатках на виток* и *десяти остатках* (в целом). Для *альфа-спирали* характерны *скошенные водородные связи*. Цилиндрическая развёртка упрощает *визуализацию*.

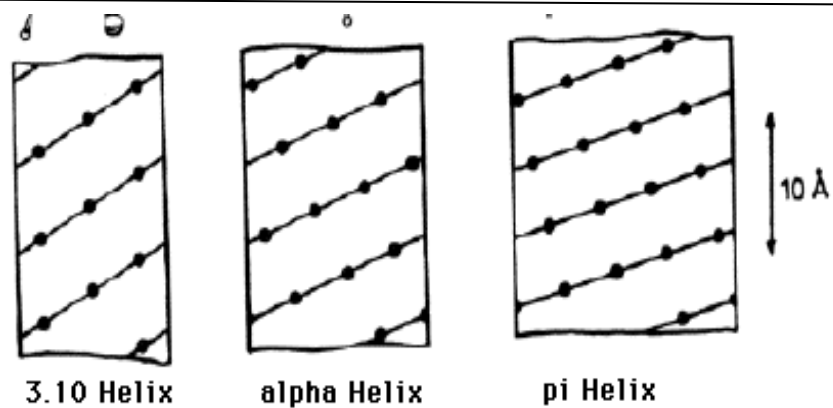


Рис. 8.4. Цилиндрические развёртки спиралей

Есть такой параметр, как **аксиальное смещение на остаток** — это подъём по оси за один виток. Для *альфа-спирали* данный показатель равен 5,4 ангстрема.

Лекция 9. Уровни структурной организации белков. Часть третья.

Мы прошли первичную и *вторичную* структуры белка. Во вторичной структуре мы начали со спиралей, которые делятся на $3/10$, *альфа-* и *пи-* *спирали*. Мы выяснили, что самой энергетически выгодной является альфа-спираль, в которой соединены СО и NH группы, между которыми четыре остатка. Также мы разобрались, что при 3,6 остатка на виток связи практически *линейные*.

Что касается *альфа-спирали*, мы говорили, что спирали *правые*, потому что аминокислоты - *левые*. И нельзя закрутить их в другую сторону, потому что боковые заместители начнут смотреть *внутрь*, а там мало места. Для *глицина* и *аланина* возможны некоторые углы, которые соответствуют правым спиральям. То есть полиаланин должен каким-то образом свернуться в левую спираль (помещая СН-группу внутри). Такая спираль на *картах Рамачандрана* будет находиться в *центрально-симметричном* районе (в 1-й четверти).

Также обращаем внимание, что в альфа-спирали существенно *распрямились* водородные связи (близки к прямой). А в случае пи-спирали водородные связи совсем *прямые*. Единственная её проблема состоит в том, что она *не стабилизируется* дисперсионными силами притяжения.

На этом мы заканчиваем разговор о спиральях и переходим к *складчатым листам*.

Складчатые листы

Итак, β -складчатый лист (*бета-фиброин* шёлка). Цепочки в нём лежат практически в *плоскости* листа (Рисунок 9.1.). Проекция на плоскости позволяет увидеть, что фрагменты полипептидной цепи принадлежат *одному* и тому же белку. Иногда бывает ассоциация разных глобул таким образом, что будут разные белки, но это другой случай.

В конечном счёте, цепочки объединяются через водородные связи (между СО- и NH-группами водородного остова). При каждом углеродном атоме поворачиваются листы цепочки (образуя *валентные* углы). Они чередуются направлениями (вверх и вниз). Поворот цепочки может повернуться двумя способами: влево, тогда две цепочки будут *разнонаправлены*; фрагмент может выйти в пространство и вернуться с левой стороны, тогда фрагменты будут *однонаправлены*.

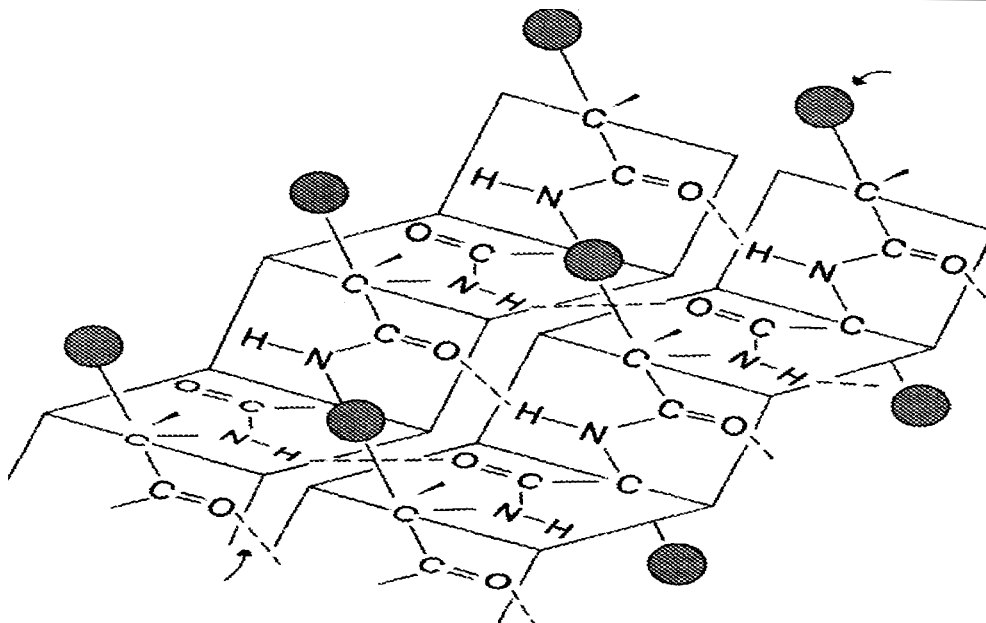


Рис. 9.1. Бета-фибрион шёлка (складчатый лист)

Долгое время считалось, что листы либо параллельны, либо антипараллельны. Последние являются чуть более энергетически выгодными, поэтому их чередование с параллельными не слишком оптимально. Но потом нашлись объекты со *смешанными* листами, хотя их очень мало.

Типичная ширина *фибриона шёлка* (где много глицина и аланина - отсюда повышенная гибкость) составляет в среднем 5-6 фрагментов. По длине это где-то от 6 до 10-12 аминокислотных остатков (с преобладанием чётных чисел). Такой бета-лист часто является основой структурного домена.

Подытог: в глобулярных белках во вторичной структуре бывает не более 20% аминокислотных остатков (в фибриллярных - почти 100%).

Итог: вторичные структуры важны, но есть разные варианты: белки, имеющие только спирали; белки, имеющие только листы; белки, имеющие и спирали, и листы; белки, не имеющие ни того, ни другого.

Сверхвторичные структуры белка

Этот уровень *определён не так ясно*, как все остальные. Место его в классификации обусловлено отнесением ко вторичной структуре. Иными словами, вторичная структура распадается на вторичный и сверхвторичный уровни. Однако, вторичные структуры можно чётко определить (в их основе лежат водородные связи). Благодаря чему существуют сверхвторичные структуры - это не до конца понятно.

Обычно говорится, что мы возьмём белок и *умозрительно* вырежем в нём некую область и назовём его **ансамблем взаимодействующих** или **взаиморасположенных вторичных структур**. А далее таких ансамблей набирается столько, сколько нужно

конкретному исследователю. *Типология* ансамблей составляется очень разнообразными способами.

Вообще, сам уровень сверхвторичных структур вызывает некоторые сомнения. К примеру, если мы узнаём о наличии *водородных* связей, то мы как минимум получаем *способ наблюдения* за состоянием глобулы (потому что существуют методы, определяющие *долю остатков* в альфа-спиральной или бета-листовой структурах). В частности, это **спектроскопия кругового дихроизма**. Так вот, в случае со сверхвторичной структурой такое наблюдение не реализуется. По-видимому, её главное назначение - определять, какие белки от каких белков произошли (сравнивать их по степени родства, старшинству и т.д.). Кроме того, возможно моделирование этих структур. Помимо всего прочего, сверхвторичные структуры очень хорошо *визуализированы*.

Самая простая сверхвторичная структура — это **две альфа-спирали, между которыми есть поворот**. Здесь стоит лишь напомнить, что поворот - это либо глицин, либо пролин.

Другой вариант — **четыре альфа-спирали (цитохром с')**. В каких же взаимодействиях они существуют при такой собранной форме? В *гидрофобных*. Иногда необходимо *организовать структуру*, которые смотрят друг на друга *неполярными* боковыми заместителями. В результате получается, что этот процесс идёт *термодинамически самопроизвольно*, потому что при выдавливании воды наружу наладится некоторое гидрофобное взаимодействие. Более того, здесь есть железное кольцо, и белок *цитохром с'* занимается в первую очередь тем, что *катализирует окислительно-восстановительные реакции* (железо меняет степень окисления).

К примеру, *угарный газ* действует именно таким образом, что не даёт связываться кислороду и останавливает электронно-транспортную сеть в определённом участке.

Есть также сверхвторичные структуры, которые состоят только из бета-листов:

1. **Тип β-сэндвич**. Здесь листы подлиннее и поуже.
2. **Тип β-бочонок**. Вид сверху говорит о том, что внешняя митохондриальная мембрана “дырявая”. Дело в том, что мембраны образуются самопроизвольно за счёт *гидрофобных* взаимодействий. Соответственно, просто дырявой она быть не может, но она может быть *проницаемой*. Митохондрии являются силовыми станциями по выработке АТФ. Её внешняя мембрана позволяет в широком объёме *обмениваться веществом* (таким, которое имеет размерность, позволяющую ему проникнуть внутрь - это своеобразное *молекулярное “сито”*). Это паринное сито пропускает соответствующие вещества внутрь.

3. **Тип $\beta\alpha\beta$** (по *Россману*). Структуры состоят из перемежающихся листов и спиралей. Эта структура и послужила толчком для выделения сверхвторичных структур.
4. **Тип α/β -подкова** (*ингибитор рибонуклеазы*). Рибонуклеаза является очень интересной в том отношении, что её *субстрат* - рНК (*длинные* цепи остатков), а сама она - один из самых *мелких* белков (чуть меньше 100 аминокислотных остатков). Ингибитор её также довольно большой. Многие

Ингибитор - это вещество, которое тем или иным образом взаимодействует с ферментом, снижая наблюдаемую скорость биокаталитической реакции. Вообще, многие ингибиторы в организме - *молекулярной* природы. Есть ситуации, когда фермент должен работать на полную мощность, а иногда он может быть практически *неактивен*. Каждый раз синтезировать фермент - *слишком энергетически затратно* (чтобы сделать одну пептидную связь, требуется 4 эквивалента АТФ). Соответственно, ферменты время от времени *снижают* свою активность, когда к ним приходит *ингибитор*, уменьшающий *каталитическую активность*.

Не стоит говорить, что такая огромная подкова ходит по всему организму. Вся эта конструкция находится внутри *определённой белковой глобулы* (хотя какие-то концы могут вылезать и связываться с рибонуклеазой).

Уровень структурных доменов

Домены бывают двух типов:

1. **Структурные**
2. **Функциональные**

Если посмотреть на *иерархический* уровень, то там присутствуют структурные домены, поскольку их можно чётко *описать*. В этом смысле, функциональный домен сильно напоминает уровень сверхвторичных структур (моделированное вырезание некоторой области белка по тем или иным правилам).

Итак, **структурный домен** — это обособленная область глобулярности. Интересная деталь состоит в том, что и белок глобулярен, и домены внутри него - тоже глобулярные. Важно то, что это *одна и та же цепочка*, которая переходит от одного домена к другому (в случае замыкания цепи получается *кольцевой полипептид*). Белки у класса эукариот *не являются кольцевыми*, в отличие от молекулы ДНК.

Структурные домены являются *сворачиваемыми*. **Биосинтез** белка идёт на рибосоме, и цепочка потихоньку растёт и передвигается. Сходя с рибосомы, домен начинает *скручиваться*. В конечном счёте, домены относительно быстро сворачиваются, а потом долго притираются друг к другу.

Ещё один важный момент состоит в том, что движущей силой любых структурных образований выше вторичного уровня является гидрофобное взаимодействие (то есть *термодинамическая решимость* белка “спрятать” внутрь как можно больше неполярных боковых заместителей). Это не значит, что там не образуются водородные связи или ковалентные связи. Однако, эти отдельные связи не являются определяющими и не создают структур.

Итак, **функциональный домен** — область структуры белка, отвечающая за ту или иную функцию. Можно привести примеры функций:

- 1) связывание с субстратом
- 2) связывание с ингибитором
- 3) связывание с антигеном тела
- 4) катализ
- 5) гормон-рецепторные взаимодействия и т.д.

Очень часто бывает так, что функциональные домены сходятся там, где сходятся несколько структурных доменов, потому что требуются центры связывания.

Подытоживая разговор об этом уровне, стоит сказать, что здесь справедливо неравенство: **один белок - это один или несколько функциональных доменов, а один функциональный домен - это один или несколько структурных доменов.**

Уровень глобулярного белка

Глобулярный белок — продукт сворачивания одной полипептидной цепи.

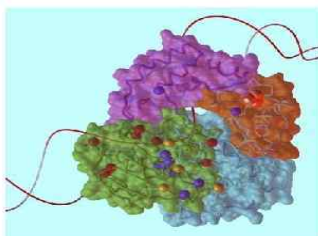


Рис. 9.2. Глобулярный белок

В данном случае, мы рассматриваем *хеликазу*. Она бежит в *начале* репликационной вилки и способствует *расхождению* белка. **Репликативная вилка** предполагает, что вначале идёт *топоизомераза*, которая раскручивает цепь, а *хеликаза* нарушает водородные связи, обеспечивая вращение.

Есть такой протеолитический фермент - *химотрипсин*. Он нарушает белки, то есть катализирует гидролиз пептидной связи при определённых участках цепи. Стоит учитывать, что протеолитические ферменты бывают *эндо-* и *экзо-*. Первым не важно, где находится специфическая аминокислота, а вторым важно наличие *карбокси-конца*.

Химотрипсин специфичен к *тироzinу* и *триптофану*. Это подразумевает большой гидрофобный карман. А *трипсин* имеет более узкий карман (с отрицательным

зарядом внизу), поэтому он специфичен к *лизину* и *аргинину*. Речь идёт о том, что химотрипсин является протеолитическим ферментом

Но если взять его и добавить NaCl (тем самым подавляя электростатические взаимодействия), восстановительную среду (так, чтобы могли восстановиться дисульфидные связи) и мочевины, мы получим *три цепочки*. Но при этом химотрипсин можно с полным правом назвать глобулярным белком. В чём же дело?

Дело в том, что ключевое слово здесь - *продукт сворачивания*. Мы уже говорили о том, что белки синтезируются на рибосомах, а они состоят из рибосомальной рНК и рибосомных белков. *Химотрипсин* синтезируется на рибосоме, сворачивается и переходит в активное состояние: “съедает” белки рибосомы (*автолиз*).

Для очень многих белков зависимость *каталитической активности* белков от *pH* описывается колоколообразной кривой. При этом есть некий оптимум (для химотрипсина в районе 7,5). Если оставить раствор химотрипсина на час при этом значении, мы получим 10% активности. При pH 3 активность будет практически нулевой. У организма такой возможности нет. Соответственно, *протеолитические ферменты* и некоторые другие синтезируются в виде *проферментов* или *зимогенов*.

Таким образом, это одна цепочка, сворачивающаяся в глобулу. После этого, они отправляются к месту действия в неактивной форме. Уже там они определённым образом самоактивируются, и выделяется ещё два дипептида (то есть четыре связи гидролизуются и производят *три цепочки*). Таким образом, химотрипсин переходит в активное состояние.

Поэтому продукт сворачивания *одной цепочки* представлен в виде трипсиногена, после чего были сделаны надрезы, и появилось три цепочки.

Четвертичные структуры белка

Ассоциаты — олигомерные белки. Они делятся на

- 1) *гомоолигомеры*
- 2) *гетероолигомеры*.

Олигомеризация гомоолигомеров предоставляет некоторые преимущества перед мономерными белками:

1. Экономия генетического материала.

Чтобы закодировать *одну* аминокислоту, нужно закодировать *три* азотистых основания. Следовательно, при большом белке ДНК будет ещё в три раза длиннее. А в эукариотической клетке довольно *мало места*. Соответственно, если можно перейти на *субъединицы*, можно в разы экономить генетический материал.

Есть классический объект исследования - *вирус табачной мозаики*. У него есть оболочка, основным материалом которой служит белок, состоящий из 1024 субъединиц. Представьте, насколько невыгодной была бы единая цепь.

2. Снижение цены ошибки при трансляции.

Это также снижает вероятность ошибки при *трансляции*. Рассмотрим пример, когда точность достигает 99,9%. Это довольно *мало* для биосинтеза белков. Если мономер из 1000 остатков, то нам в среднем не удастся сделать ни одного хорошего белка при такой точности. А если у нас будет 4 глобулы по 250 остатков, то как минимум $\frac{3}{4}$ белка будет произведено правильно. Иными словами, чем меньше субъединицы, тем меньше будет ошибочная партия синтезируемого белка.

3. Снижение потерь при нерегулярности мембран (?).

При появлении первых организмов мембраны были гораздо более проницаемыми. Со временем белки научились образовывать *олигомеры*, которые не пролезали в мембранное “сито”. Но здесь стоит сказать, что любые мембраны образуются за счёт *гидрофобных взаимодействий*. Поэтому *нерегулярные мембраны* являются скорее гипотетическим предположением.

Олигомеризация гетероолигомеров предоставляет некоторые преимущества перед мономерными белками:

1. Полифункциональный катализ (“конвейер”).

Возьмём пример: *гликолиз* заканчивается тем, что образуется *пируват* (пировиноградная кислота). В условиях кислородной (*аэробной*) среды, с большой долей вероятности дело пойдёт к *циклу Кребса*, и далее - в электронно-транспортную сеть. В цикл Кребса входит *уксусная кислота* в виде тиоэфира с коферментом-А (ацетил). Интересно, что в переходе от пирувата до ацетила всего-то теряется *карбокисильная* группа, а карбонильная *окисляется* до карбокисильной.

Чтобы преодолеть эту стадию, требуется *три фермента, пять коферментов* (соответственно пяти стадиям) и *два регулятора* (причём, с дубликаторами). Что бы было, если бы все эти ферменты плавали по отдельности? Чем бы определялась скорость всего процесса? *Диффузией*. А это очень медленный процесс. Соответственно, при этом мы бы продвигались медленнее, чем расходовалась бы энергия. Поэтому организм берёт их все и сбивает в *единый блок (пируватдегидрогеназный комплекс)* с большой массой (6,5 млн килодальтон). Фактически мы получаем конвейер.

2. Уникальная геометрия ассоциатов.

3. Кооперативное взаимодействие.

Если у нас есть цепь последовательных событий, они могут не оказывать друг на друга никакого влияния. Но бывают ситуации, когда события складываются таким образом, что каждая последующая стадия либо *облегчает* её, либо *осложняет*. Это свойство и называется **кооперативностью** (*положительной* или *отрицательной*).

Возьмём в качестве примеров *нитрование* (каждый следующий процесс идёт легче) и *введение бензольной группы в кольцо* (каждый следующий процесс идёт тяжелее). Соответственно, очень часто кооперативное взаимодействие встречается в виде

биомолекул. В случае белка *гемоглобина* мы имеем *транспортную* функцию: гемоглобин загружается кислородом в лёгких. В каждом гемоглобине *4 субъединицы*, и в каждой цепи есть *порфириновое кольцо* с железом. Это даёт возможность *связывать кислород* и доставлять его к *периферическим тканям*, а также определённым способом *выводить углекислый газ*.

Теперь мы возьмём график, в котором отражено *отношение доли белка, связанного с кислородом (в %)* к *парциальному давлению* кислорода (Рисунок 9.3.). Оказывается, что в лёгких гемоглобин оказывается полностью загружен кислородом, а в мышцах он отдаёт кислород, и кривая опускается. Это кривая, так как связывание первой молекулы обеспечивает лёгкость связывания следующей (пока не насытятся все центры). Для этого необходимо *несколько центров связывания*. Это и есть *кооперативный эффект*.

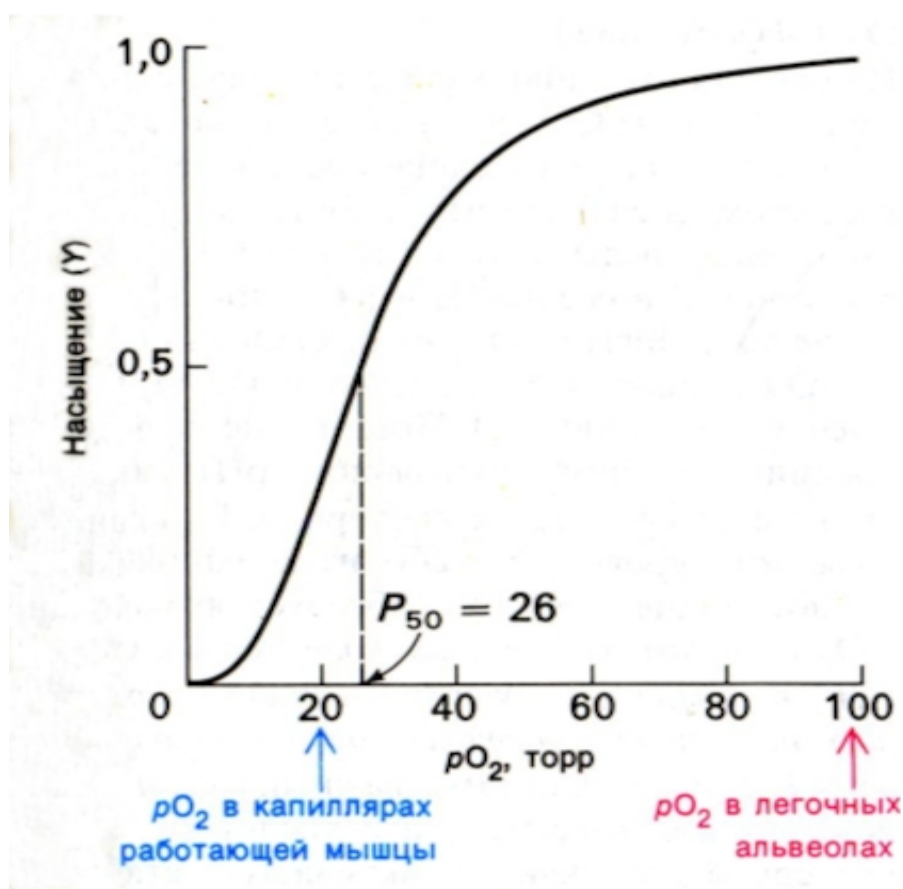


Рис. 9.3. График отношения доли белка, связанного с кислородом (в %) к парциальному давлению кислорода

Есть другой белок - *миоглобин*. Для него кривая будет выглядеть иначе: в условиях мышц будет почти полностью загружен. Он начинает отдавать кислород в экстренном случае (при очень низком уровне кислорода).

На этом мы закончили раздел структурной организации белка.

Лекция 10. Ферментативная кинетика. Часть первая.

Перед тем, как приступить к ферментативной кинетике, нужно сказать несколько вещей о том, что из себя представляют ферменты.

Я представлю себе глобулярный белок и констатирую, что примерно 9/10 его аминокислотных остатков напрямую не задействуется в катализе (если это фермент). Более того, там ещё могут быть небелковые активные группы. Примерно 10% остатков образует так называемый активный центр. В первом приближении активный центр можно поделить на две части:

- 1) **Участок (или сайт) связывания.** Сюда садится субстрат таким образом, чтобы быть удобным ориентированным (которая напрямую задействуется в катализе) легко доступным для группы X активного центра. Как вариант, можно взять нуклеофильную атаку на карбонильный углерод субстрата -ОН или -SH остатков аминокислоты.
- 2) **Каталитический участок (или сайт).**

Реакция является термодинамически выгодной. На графике будет ясно, что по уровню фермент+субстрат продукт окажется ниже. Если же реакция идёт не ферментативным образом, то энергия активации требуется большая, и процесс идёт медленнее. Что же происходит в случае фермента? Как мы уже говорили, одностадийный процесс распадается на несколько этапов. К примеру, гидролиз пептидной связи под действием сириновых протеаз имеет минимум четыре стадии.

Возьмём двухстадийный процесс. $E + S \rightleftharpoons ES$. Образуется ферментный комплекс. Далее он распадается с регенерацией фермента и образованием продукта. Это так называемое уравнение Михаэлиса-Ментен. Соответственно, что за загадка на первой стадии? Субстрат вдруг попадает в активный центр (частично), и этот центр геометрически подходит субстрату. Если молекула будет иной формы, она не влезет в уготованное ей место посадки.

Этот процесс требует некоторой активации (будучи химической реакцией), и мы приходим к ситуации, когда уменьшается энтропия. Здесь важно то, что когда мы фиксируем субстрат, у нас теряются поступательные способности субстрата, а также часть его вращательных и колебательных способностей. Более того, субстрат встраивается с правильной ориентацией.

При этом, надо отметить, энтропийные проигрыши компенсируются невалентными взаимодействиями. Взять, например, химо tripsin: он специфичен остатком триптофана и тирозином с большим гидрофобным объёмом. В большой гидрофобный карман заходит триптофан, выдавливая воду, и образуются гидрофобные взаимодействия. Если это какой-то полисахаридный носитель, то конечно главенствуют водородные связи. В случае tripsина мы имеем специфичность аргинину и лизину, и

внизу гидрофобного кармана добавляется остаток *отрицательного* заряда (*аспартам*). И тогда к гидрофобным взаимодействиям добавляется ещё *электростатика*.

Но в целом невалентные взаимодействия налаживают какие-то связи, поэтому имеет место некая компенсация (в разных случаях - разная). А теперь главное: мы зафиксировали субстрат, отыграли немного энтропии, и при этом мы продвинулись по координате реакции к продукту. Соответственно, путь стал ближе.

Если у нас *многостадийный* процесс, то скорость всего процесса определяется скоростью *самой медленной* стадии (скорость *лимитирующая*). Фермент *ускоряет* реакции за счёт того, что *раскладывает* одностадийный процесс с высокой энергией активации на *несколько стадий*. Конечно, реальный фермент работает по гораздо *более сложной* схеме, но обычно получается так, что экспериментально полученные точки *удовлетворительно* описываются введённым *уравнением Михаэлиса-Ментен*.

Нековалентные взаимодействия окружают нас повсюду. Они играют огромную роль как в живой, так и в неживой природе.

Двухстадийная схема Михаэлиса-Ментен

Вот само уравнение: $E + S \rightleftharpoons ES - (K_2) > E + P$.

В первую очередь нас интересует *скорость ферментативной реакции* (V). При этом мы знаем *концентрацию субстрата* и *фермента*. Чему равна скорость?

$$V = \frac{d[p]}{dt} = k_2 \cdot [ES]. \text{ Осталось найти } k_2.$$

Померить её сложно. Даже такую простую схему в аналитическом виде рассчитать будет тоже очень *сложно*. Математика особенно важна при работе с *нестандартными* условиями (когда нет равновесных или квази-стационарных). Забегая вперёд, можно сказать, что исходную форму можно упростить, сделав некоторое допущение:

1. Допустим, что **начальная концентрация фермента много меньше** (не менее *двух порядков*) **начальной концентрации субстрата**. Это так, потому что ферменты обладают уникальной каталитической активностью (работают быстро).

$$[E]_0 \ll [S]_0$$

2. Мы будем рассматривать **начальную скорость реакции** (V_0).

$$V_0 \equiv [p] = 0 \equiv [S] = [S]_0$$

То есть мы имеем в виду скорость в *начальный момент времени*, когда продукта в системе ещё практически нет. Иными словами, **равновесная концентрация субстрата равна его начальной концентрации**. В каких формах может существовать субстрат? В *свободно-субстратной*, *субстратно-ферментного комплекса* и *субстратно-продуктной*. Можно считать, что на начальном этапе практически весь субстрат представлен *чисто субстратно*.

3. Подставим константу квазиравновесия на первой стадии (K_s). Все константы ферментативной кинетики имеют смысл констант диссоциации.

Итак, нам надо найти ES . Но сначала необходимо записать уравнение материального баланса по компоненту в недостатке. В недостатке у нас фермент, поэтому пишем:

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

Мы имеем одно уравнение с двумя неизвестными. Нужно найти второе уравнение, чтобы была система:

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

$$K_s = \frac{[E][S]_0}{[ES]}$$

Нужно в одном уравнении выразить E и подставить его во второе:

$$[E] = [E]_0 - [ES]$$

$$K = \frac{([E]_0 - [ES])[S]_0}{[ES]}$$

Нам нужно прийти к ES . Переносим всё на другую сторону:

$$[ES](K_s + [S]_0) = [E]_0[S]_0$$

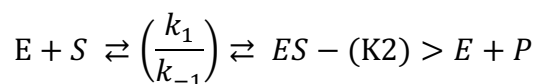
Теперь мы можем выразить ES в следующем виде:

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0}$$

Таким образом, мы можем определить искомую скорость (V):

$$V_0 = \frac{[E]_0[S]_0}{K_s + [S]_0}$$

Теперь возьмём другое допущение: в системе установилось **квазистационарное состояние по фермент-субстратному комплексу** (то есть скорость его образования примерно равна скорости его расходования). В таком случае начальное уравнение будет иметь следующий вид:



В данном случае $K(2)$ - это константа скорости реакции. Речь идёт о том, что сумма констант скоростей образования фермент-субстратного комплекса равна сумме констант его расходования (постоянная величина):

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Тогда мы можем записать, что фермент-субстратный комплекс образуется только одним путём:

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$
$$k_1[E][S]_0 - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

А дальше всё преобразуется точно так же, как при прошлом условии:

$$[E] = [E]_0 - [ES]$$
$$k_1([E]_0 - [ES]) - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$$

Раскрываем скобки, переносим всё с ES вправо, и получается:

$$k_1[E]_0[S]_0 = [ES](k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2)$$

Промежуточный итог получается таковым:

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]_0}{k_1[S]_0 + k_{-1} + k_2}$$

Тогда в результате у нас получится следующее выражение:

$$V = \frac{k_1 k_2 [E]_0 [S]_0}{k_1 [S]_0 + k_{-1} k_2}$$

Дело в том, что получившееся выражение *не очень стандартного* типа. Нам нужно его преобразовать, разделив числитель и знаменатель на $K(1)$.

$$V_0 = \frac{k_2 [E]_0 [S]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]_0}, \text{ где } \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \text{ есть константа Михаэлиса (Км).}$$

А теперь попробуем выразить $k(s)$ через *константу скоростей*:

$$k_s = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

То есть *разница* между двумя приближениями в том, что учитываются либо два маршрута, либо только один (от фермент-субстратного комплекса).

Итак, мы получили **выражение для начальной скорости ферментативной реакции для двухстадийной схемы Михаэлиса -Ментен с указанными приближениями** (согласно допущениям 1,2,3). В одном случае мы получили $k(s)$, а в другом K_m .

Теперь нам надо перейти к *графическому анализу* полученного. В первую очередь делаем предположение, что кинетика может описываться в двухстадийной схеме. Что является критерием описываемого? Правильный вид *зависимости*. Первое, что следует проверить - вид зависимости начальной скорости от концентрации фермента (по 3-4 точкам, Рисунок 10.1.).



Рис. 10.1. График зависимости начальной скорости от концентрации фермента

Мы видим, что это *прямая, идущая в начало координат*. Далее надо проверять зависимость от S_0 . Для этого может быть использован любой физико-химический метод, достаточно чувствительный к тому, что образовался продукт. Довольно часто это **спектрофотометрия**. Но может получаться *флуоресцирующий* продукт или исчезать *флуоресцентный* субстрат, и тогда это будет **флуоресцентная микроскопия**.

А может образовываться *кислота*, и тогда это будет **метод рН-статирования**. В случае инвертазы можно следить за **изменением удельного вращения**. И так далее.

Мы параллельно или последовательно готовим системы (практически идентичные), которые различаются только *концентрацией фермента*. Мы измеряем активность в каждом из случаев: **чем больше фермента, тем больше приращение оптической плотности, и скорость выше**. Кроме того, важно взять широкий интервал (не менее одного порядка).

Итак, с ферментом всё прошло хорошо. Теперь рисуем вид зависимости начальной скорости от концентрации субстрата.

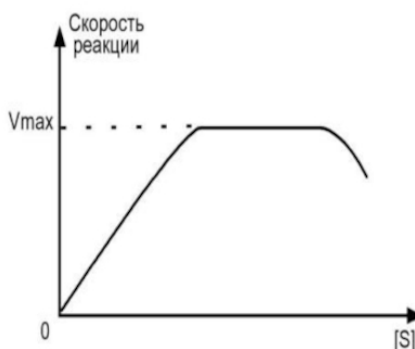


Рис. 10.1. График зависимости начальной скорости от концентрации субстрата

Давайте рассмотрим ситуацию, когда субстрата в системе *очень мало*. Мы можем пренебречь S_0 . Это будет *прямая*. А теперь возьмём случай, когда субстрата *очень много*

(Рисунок 10.2.). Тогда по достижении определённой концентрации субстрата, скорость уже не растёт. Давайте посмотрим, чему равно это предельное значение скорости:

$$V_{max} = k_2[E]_0$$

А давайте посмотрим ещё и на половинный параметр. При какой концентрации субстрата он достигается?

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]_0}{K_m + [S]_0} \Rightarrow K_m + [S]_0 = 2[S]_0 \Rightarrow K_m = S_0$$

Таким образом, параметры V_{max} и K_m сравнить не получается, поскольку они измеряют *разные оси* и имеют *разную размерность* (скорости и концентрации, соответственно).

Ещё один вопрос: для *одного* фермента K_m установили равную 1 миллимоль/литр, а для *другого* - 1 микромоль/литр. Какая *фермент-субстратная* пара подходит друг другу лучше? Там, где $K_m = 1$ микромоль/литр. То есть, **чем меньше константа Михаэлиса, тем меньше надо концентрации субстрата для достижения полумаксимальной и максимальной скорости связывания.** Это по смыслу определено тем, что речь идёт о константах *диссоциации*.

Методы линеаризации уравнений

Собственно говоря, K_m и V_{max} являются *параметрами*, характеризующими данную пару фермент-субстрат. Если мы возьмём $y = ax + b$, то *переменными* будут x и y . Они будут изменяться по осям для любого случая (любой фермент-субстратной пары). А *параметры* (a , b) будут задавать *конкретную прямую*. Если у нас $a > 0$, то прямая *возрастает* (угол наклона = a) если же $a < 0$, то прямая *убывает*.

В нашем случае переменными будут являться *начальные концентрации субстрата и фермента*. А параметрами будут V_{max} и K_m (это *табличные данные*).

Нам нужен способ определения V_{max} и K_m . Для этого необходимо взять ряд точек, построить по ним график и рассчитать. Для этого сейчас используются *компьютеры*. Но так было не всегда. В *доцифровую* эпоху такой возможности не было. Однако, не всё так плохо.

В каком же случае мы получаем надёжные параметры? Когда мы рассчитываем прямую: там есть *тангенс угла наклона* (a) и *отрезки*, отсекаемые *на двух осях* (x, y). Поэтому приведённое выше уравнение можно привести к *линейному виду*, осуществив преобразование.

Существует масса методов *линеаризации*. Мы поговорим о самом известном из них — **методе двойных обратных координат Лайнуивера-Бёрка**. Почему речь идёт об обратных координатах? Потому что мы *переворачиваем* уравнение, и от зависимости V_0 от S_0 переходим к зависимости $1/V_0$ от $1/S_0$.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

И далее мы строим зависимость, в которой получится *возрастающая* прямая. Таким образом, полученные в предыдущем графике точки переворачиваются, и по ним проводят прямую, продолжая её до пересечения, получая две точки: *тангенс угла наклона, K_m/V_{max}* (Рисунок 10.3.). Можно брать тангенс любого из отрезков, либо просто два отрезка.

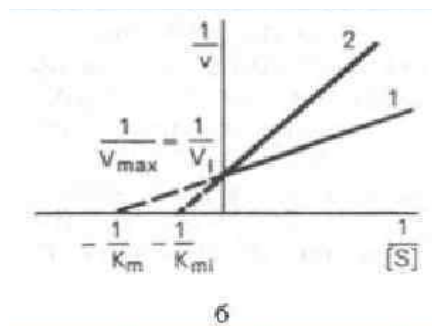


Рис. 10.3. Тангенс угла наклона, K_m/V_{max}

Отсюда, изменив знак, очень просто получить K_m и V_{max} . А если разделить V_{max} на концентрацию фермента, получим $k(2)$.

Лекция 11. Ферментативная кинетика. Часть вторая.

Мы посмотрели, за счёт чего *ферменты ускоряют* химические реакции. Мы установили, что они делают это за счёт того, что *раскладывают одностадийный процесс* с высокой энергией активации на несколько стадий с пониженной энергией. Особо нужно подчеркнуть, что **ферменты** — это биологические катализаторы, поэтому они в равной степени ускоряют *прямую* и *обратную* реакции, никак не влияя на положение *термодинамического равновесия*.

Также стоит напомнить, что по окончании каталитического цикла ферменты возвращаются в исходное состояние.

Далее мы занялись кинетикой и рассмотрели ситуацию **ферментативного процесса** (когда есть только пара *фермент-субстрат* и растворитель), который описывается *уравнением Михаэлиса-Ментен*. Мы сделали определённые допущения (1,2,3). Во-первых, мы заявили, что **начальная концентрация фермента намного меньше начальной концентрации субстрата**. Во-вторых, мы сказали, что нас интересует **начальная скорость** (и мы пренебрегаем продуктом, поэтому субстрат представлен в чистой форме). В-третьих, мы ввели **два варианта допущения о приближении**:

1) у нас в системе установилось *квазиравновесное приближение* (распад и образование фермент-субстратного комплекса);

2) *квазистационарное приближение*, когда мы считаем, что скорость образования фермент-субстратного комплекса по всем путям равна скорости его распада по всем путям. Мы установили, что эти два случая различаются только тем, что во втором случае учитывается второй путь к продукту, а также тем, что в одном случае мы имеем *константу диссоциации* $k(s)$, а в другом - *константу Михаэлиса* (K_m).

Наконец, мы проанализировали данные зависимости скорости в прямых и обратных координатах. Для ферментов это *линейная* зависимость (*прямая*), выходящая за пределы координатной оси. Если всё нормально, то мы переходим от зависимости от начальной скорости к зависимости от начальной концентрации субстрата. Соответственно, в прямых координатах это будет *гиперболическая* зависимость, а в обратных - *линейная*.

Максимальная скорость реакции (V_{max}) — это произведение каталитической константы $k(2)$ на начальную концентрацию фермента.

Константа Михаэлиса (K_m) — это такая концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна полу-максимальной.

Мы также поговорили о способах расчёта V_{max} и K_m , таких как *линеаризация*. В частности, мы разобрали метод обратных координат, когда мы переходим к зависимости

$1/V_0$ к зависимости $1/S_0$. В результате у нас выходила возрастающая прямая, приподнятая над началом координат.

Классификация ферментов

Ферменты бывают самые разные. Есть общепринятый **классификатор ферментов (КФ)**, в котором 4 группы наименований. Вторая группа наименований указывает на **подкласс**. Третья группа наименований указывает на **под-подкласс**. Четвёртая группа наименований указывает на **конкретный фермент**. В качестве примера возьмём 1.1.1.1 - это *алкоголь-дегидрогеназ*.

Первая группа указывает на один из **6 больших классов ферментов**:

1. Оксидоредуктазы.

Это ферменты, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции. Там всегда есть *пара окислитель / восстановитель*. Кроме того, это всегда перенос электронов, часто сопряжённый с переносом *протонов*. Есть два варианта окисления: 1) введение атома кислорода (*оксигеназы*); 2) изъятие атома водорода (*дегидрогеназы*).

2. Трансферазы.

Это ферменты, которые переносят группы, отличные от атома водорода (*метильную, фосфатную* и другие) с одного соединения (субстрата) на другой.

3. Гидролазы.

Это ферменты, которые в прямом виде катализируют реакции гидролиза, то есть расщепления связей под действием воды. Могут разрываться *CO-, CN-* и другие связи. В обратном виде гидролазы будут катализировать реакции конденсации (синтеза). Это значит, что с помощью гидролазы можно синтезировать пептидную связь. Если научить фермент работать в среде органических растворителей (при должной стабилизации), то мы получим двухфазную систему, в которой плохо растворимый в воде субстрат будет находиться в органическом слое, а фермент - в воде. Каким-то образом субстрат будет немного распределяться в воду (по коэффициенту распределения) и превращаться ферментом в *продукт*, который будет возвращаться обратно в органический растворитель. При помощи *протеолитического* фермента можно добиться практически стопроцентной конверсии. Проблема только в том, что это займёт *очень много времени*.

4. Лиазы.

Это ферменты, которые тоже работают в *обе стороны*. В прямую сторону они расщепляют CO- и NH- с образованием двойной связи. В обратную сторону это будут **синтазы**. Они не требуют второго участника, который даст энергию.

5. Изомеразы.

Их довольно много, и они делятся на различные *подклассы*. Изомеразы, к примеру, содействуют превращению кетоз в альдозы. Кроме того, они могут переносить группы в пределах одной молекулы.

6. Лигазы.

Это ферменты, которые катализируют соединение двух молекул с образованием связи. В обратную сторону это будут **синтетазы**. Они требуют высокоэнергетическое соединение, содержащее часто фосфатную группу, которая гидролизуется. Чаще всего это АТФ. Но это может быть также креатинфосфат.

Что касается **транслоказ**, то они в моём понимании не являются ферментами, потому что они переносят молекулы в исходном виде. Когда мы говорим о ферментах, мы всё же говорим о наличии химической реакции.

Эффекторы

Эффекторы — это вещества, которые оказывают влияние на наблюдаемую скорость ферментативной реакции. В данном случае говорим о количестве продукта, производимого за единицу времени.

Эффекторы могут быть двух типов:

1. **Ингибиторы.**
2. **Активаторы.**

Мы будем говорить об **ингибиторах**, но всё сказанное будет также справедливо и для активаторов. Ингибиторы бывают разными. Их можно классифицировать по разным признакам.

1. По обратимости:

1.1. **Обратимые.**

Это те ингибиторы, которые можно убрать (снизив их концентрацию), и тогда наблюдаемая скорость реакции полностью восстановится. Как можно их убрать? К примеру, есть диализ. В организме обратимых ингибиторов большая часть. Организм не может существовать при максимальной эффективности работы всех ферментов сразу. То есть, в любой момент времени должен преобладать либо катаболизм (расщепление еды) либо анаболизм (синтез собственных молекул). Соответственно, нам нужен способ “включения / выключения” ферментов. Присоединяясь к ферментам, ингибиторы временно снижают их активность.

Бывают случаи:

1.1.1. **Полностью конкурентного ингибирования.** Если ингибитор похож на субстрат (с точки зрения тех групп, которые связываются), но не может быть превращён, то он занимает центр связывания. Получается, что меньшее количество молекул может работать с субстратом. Выглядит это как ухудшение константы Михаэлиса. При этом если в активный центр заходит субстрат, то его превращение группой X сработает.

Активный центр не меняется, катализ возможен, но эффективная концентрация свободных молекул фермента падает.

1.1.2. **Полностью неконкурентного ингибирования.** У нас есть *отдельный сайт для связывания* ингибитора. Как только он связывается, происходят *конформационные изменения*. При этом субстрат хорошо связывается, а группа X удаляется от субстрата. Соответственно, наблюдаемая скорость падает. При этом в случае полной неконкурентности у нас никак не меняется константа Михаэлиса, но ухудшается каталитическая константа.

Часто реализуется **промежуточная ситуация** между этими типами ингибирования.

1.2. Необратимые.

Они связываются с ферментом и блокируют возвращение фермента к исходному состоянию (скорость реакции снижается до 0). Чаще всего это модификация ковалентных связей, причём в активном центре. Классический пример - это *фосфорорганика*, которая бьёт по *ацетилхолинэстеразе* (зарин, заман и т.д.). Ингибиторы ковалентно модифицируют ОН-группу серина, которая в активном центре играет самую главную каталитическую роль.

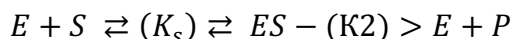
Бывают ли ситуации, когда необратимыми ингибиторами в лаборатории пользуются с полезной целью? Чаще всего, когда надо *остановить реакцию*, а потом её нужно *возобновить*.

Также есть ещё одно важное применение. Если нам необходимо поделиться характеристиками конкретной пары фермент-субстрат, нам нужно публиковать два параметра: *константа скорости* (K_m) *константа каталитическая*. Что нужно сделать для получения последней? Определить $1/V_{max}$, перевернув её, получить V_{max} , а далее разделить её на *начальную концентрацию фермента*. Откуда мы её знаем? По навеске. Но откуда знаем его *активную часть*? Нужно *титровать* активные центры. Берётся навеска белка и в нём определяется активная часть.

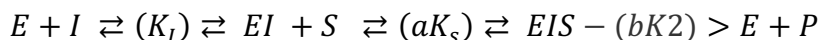
Есть варианты титрования **обратимые** и **необратимые**. К примеру, *сериновые протеазы* можно титровать с помощью *фенилметилсульфонилфторид* - классический *необратимый ингибитор*. После добавления мы смотрим на *оптическую плотность* по определённой длине волны. Далее мы пересчитываем, какая доля белка пребывает в *рабочем состоянии*.

Общая схема ингибирования

Общая схема ингибирования записывается следующим образом:



Далее фермент может связаться с ингибитором (с константой ингибирования K_i):

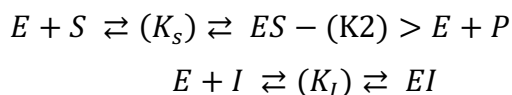




Эта схема касается системы с *одним ингибитором*. Молекула фермента может связаться *либо* с одной молекулой субстрата, *либо* с одной молекулой ингибитора, *либо* с обеими по одной.

Полное конкурентное ингибирование

Что будет с этой схемой в случае **полного конкурентного ингибирования**? У нас может образоваться тройной комплекс? Нет. То есть последней части быть не должно в принципе. Какие значения должны принимать альфа и бета? *Бета не имеет смысла*, потому что вообще не образуется S. Что касается альфа, то дело обстоит так: чем *больше* у нас K_s (константа *диссоциации*), тем *меньше* комплекса ES. Соответственно, если у нас совсем нет EIS, то величина aK_s будет огромной (при *альфа = бесконечности*). Тогда наша схема превращается в следующий вид:



Нам надо ввести некие ограничения (упрощения):

- 1) $[E]_0 \ll [S]_0, [I]_0$. То есть, субстрата и ингибитора в системе значительно больше, чем ингибитора.
- 2) $[S] = [S]_0, [I] = [I]_0$
- 3) Все равновесия (два) установлены.

Теперь мы можем делать систему, начиная с *материального баланса* того, что у нас доставлено:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI].$$

Таким образом, мы имеем *целых три неизвестных*. Но зато у нас есть два равновесия:

$$K_s = \frac{[E][S]_0}{[ES]} ; K_I = \frac{[E][I]_0}{[EI]}$$

Теперь эту систему из трёх уравнений нужно решать. Сперва мы избавимся от EI:

$$[EI] = \frac{[E][I]_0}{K_I} \implies [E]_0 = [E] + \frac{[E][I]_0}{K_I} + [ES]$$

Тогда

$$[E]_0 = [E] \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + [ES]$$

Теперь выведем отсюда E. При этом мы исходим из того, что $V_0 = K_2[ES]$. Тогда

$$[E] = \frac{K_s[ES]}{[S]_0}$$

Что у нас получается таким образом?

$$[E]_0 = \frac{[ES]K_s}{[S]_0} \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + [ES]$$

Выносим ES за скобку. Что остаётся?

$$[E]_0 = [ES] \left(\frac{K_s}{[S]_0} \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + 1 \right)$$

Давайте выразим ES и сразу напишем скорость:

$$V_0 = \frac{K_2[E]_0}{\frac{K_2}{[S]_0} \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + 1}$$

Мы всегда стараемся приводить уравнение к *стандартному* виду. Поэтому давайте умножим числитель и знаменатель на S_0 . Тогда мы можем записать следующее:

$$V_0 = \frac{K_2[E]_0[S]_0}{K_s \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\right) + [S]_0}$$

В результате преобразования мы получили **выражение для начальной скорости в случае полного конкурентного ингибирования**. Но теперь нам надо проверить результаты на соответствие здравому смыслу.

Мы говорили о том, что полное конкурентное ингибирование сказывается на связывании, но каталитическая константа при этом не изменяется. За связывание в нашем уравнении отвечает *знаменатель* (константа Михаэлиса), а за каталитическую часть - *числитель*. Получается, что **эффективность катализа (с уже связавшимся ферментом) не меняется**. Это вроде бы адекватно.

Изменения произошли в случае связывания. Давайте проверим их. I_0 и K_I оказались положительными величинами. Соответственно, $1 +$ положительное будет *больше 0*, а K_s , умноженное на эту скобку - *ещё больше*. Соответственно, наблюдаемая скорость будет меньше.

Определение констант

Теперь посмотрим вот что. Мы можем ставить серии экспериментов. Допустим, у нас есть задача: при *усложнении* системы (3 компонента: фермент, субстрат, ингибитор), мы должны определить все константы. Но теперь нам надо, помимо K -каталитической и K -скорости, найти ещё $K(i)$. Мы будем пользоваться **методом обратных координат**.

Мы фиксируем *концентрацию ингибитора*. Далее мы варьируем *концентрацию субстрата*, замеряя *скорость*. Мы набираем некоторые точки и проводим по ним **линеаризацию**. На оси ординат мы определяем $1/V_{max}$ (причём легко, так как в знаменателе ничего не поменялось), а по оси абсцисс мы определяем $-1/K_m$ (*кажущуюся*).

Из качественных соображений дальше мы должны менять концентрацию ингибитора и строить это на графике в каких-то точках.

У нас есть K_m (каж) = $K(1 + \frac{[I]_0}{K_I})$. Соответственно, мы берём *три разных концентрации ингибитора* и делаем три таких серии замеров. В какой точке на графике они пересекутся? На *V_{max}*. Мы получим *пучок прямых*. Концентрация ингибитора (I_0) изменяется по часовой или против часовой? *Против часовой*.

Дело в том, что **чем более против часовой, тем меньше отрезок отрицательного значения**. Самое маленькое значение в минусе - это $-1/K_m$ (каж.). А мы помним, что **чем больше K_m (каж.), - которую перевернули, - тем хуже подходят друг другу фермент и субстрат** (в данном случае это соответствие портит ингибитор).

А теперь, чтобы завершить наш эксперимент, нам осталось определить *координаты*, в которых мы найдём *истинные* константы: $K(s)$ и $K(i)$. Мы будем строить прямую зависимость. Если мы отметим на оси абсцисс K_m (каж.), а по оси ординат I_0 , то тангенс угла наклона будет *больше нуля*, а значит *прямая возрастает*. А добавочный член будет тоже больше нуля. Пересечение с осью $y = K(s)$. А с осью x пересечение = 0, соответственно, при переносе получается $-K(s)$, умноженное на $K(i)$. Тангенс угла наклона будет равняться $\frac{K_s}{K_I}$.

Можно в отдельном эксперименте строить K_m (каж.). То есть, перейти к такому выражению:

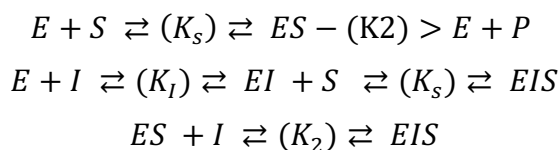
$$\frac{K_m \text{ (каж.)}}{K_s} = 1 + \frac{[I]_0}{K_I}$$

Первая часть уравнения = 0, и в этом случае пересечение с осью x будет I (что ничего нам не даёт), а тангенс угла наклона будет $1/K(i)$. Но так как мы уже знаем $K(s)$, нам будет этого достаточно. А с осью y будет $I_0 - K(i)$.

Полное неконкурентное ингибирование

В случае **полного неконкурентного ингибирования** $\alpha = 1, \beta = 0$. То есть, в таком случае у нас *ES не будет давать продукта*.

Давайте изобразим схему:



Используем все те же допущения:

- 1) $[E]_0 \ll [S]_0, [I]_0$. То есть, субстрата и ингибитора в системе значительно больше, чем ингибитора.
- 2) $[S] = [S]_0, [I] = [I]_0$
- 3) Все равновесия (два) установлены.

В первую очередь мы пишем *материальный баланс по ферменту*:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [EIS]$$

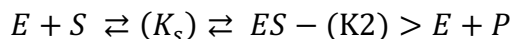
Сколько *переменных* мы имеем? *Четыре*. Значит понадобится ещё три уравнения.

$$K_s = \frac{[E][S]_0}{[ES]} ; K_I = \frac{[E][I]_0}{[EI]} ; K_S = \frac{[EI][S]_0}{[EIS]}$$

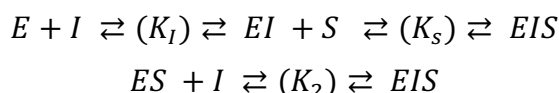
Далее следует простое *решение системы данных уравнений*, что мы уже неоднократно делали на других примерах.

Лекция 12. Разбор задачи по ферментативной кинетике.

Мы проходили **полное неконкурентное ингибирование**. И оно записывалось в виде формулы:



При этом была отдельная возможность для связывания ингибитора с образованием *тройного* комплекса:



Поскольку у нас *ингибитор* и *субстрат* имеют разнесённые в пространстве независимые участки, они не чувствуют друг друга. Таким образом, группа-X не может добраться до субстрата, атакуя его в активном центре. Мы начинали с материального баланса по ферменту:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [EIS]$$

Поскольку у нас четыре неизвестных, нам нужно ещё три уравнения:

$$K_s = \frac{[E][S]_0}{[ES]} ; K_I = \frac{[E][I]_0}{[EI]} ; K_s = \frac{[EI][S]_0}{[EIS]}$$

Сначала мы избавляемся от EIS в формуле баланса.

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [EIS] = [E] + [ES] + [EI]\left(1 + \frac{[S]_0}{K_s}\right)$$

Тогда выразим отсюда EI:

$$[EI] = \frac{[E][I]_0}{K_I} \quad \text{Тогда} \quad [E]_0 = [E]\left(1 + \frac{[I]_0}{K_I}\left(1 + \frac{[S]_0}{K_s}\right)\right) + [ES]$$

Теперь осталось подставить E в формулу константы, чтобы осталось ES:

$$[E] = \frac{K_s[ES]}{[S]_0}$$

Соответственно получаем

$$[E] = \frac{K_s[ES]}{[S]_0} \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I} \left(1 + \frac{[S]_0}{K_s}\right)\right) + [ES]$$

Попробуем вынести ES за скобку с выражением ES.

$$[ES] = \frac{[E]_0}{\frac{K_s}{[S]_0} \left(1 + \frac{[I]_0}{K_I} \left(1 + \frac{[S]_0}{K_s}\right)\right) + 1} =$$

Двигаясь к стандартному виду, давайте умножим эту конструкцию на S_0 .

$$= \frac{[E]_0[S]_0}{K_S(1 + \frac{[I]_0}{K_I}(1 + \frac{[S]_0}{K_S})) + [S]_0} = \frac{[E]_0[S]_0}{K_S(1 + \frac{[I]_0}{K_I} + \frac{[I]_0[S]_0}{K_I K_S}) + [S]_0} =$$

$$= \frac{[E]_0[S]_0}{K_S(1 + \frac{[I]_0}{K_I}(\frac{K_S + [S]_0}{K_S}))} = K_S + \frac{K_S[I]_0}{K_I} \cdot \frac{K_S + [S]_0 + [S]_0}{K_S} =$$

при этом сокращаем $K(s)$ и выносим $K(s) + S_0$

$$= (K_S + [S]_0)(1 + \frac{[I]_0}{K_I})$$

Теперь мы можем перейти к скорости V_0 .

$$V_0 = \frac{K_2[E]_0[S]_0}{(K_S + [S]_0)(1 + \frac{[I]_0}{K_I})} =$$

Мы имеем форму *не слишком стандартную*. А во-вторых, наше ингибирование касается *катализа* (то есть *числителя*). А у нас что-то произошло в знаменателе. Значит надо объединить с $K(2)$. Таким образом, получается:

$$= \frac{\frac{K_2}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0}$$

Теперь всё встало на свои места. У нас что-то произошло с *катализом* (K -каталитическая изменилась), при сохранении *связывания неизменным*. Проверяем эти результаты на соответствие здравому смыслу: I_0 *больше* 0, I_0/K_I *больше* 0, знаменатель стал *больше* 1. Соответственно, скорость снизилась.

Давайте теперь посмотрим по графику. Зависимость для трёх разных концентраций будет выглядеть как $[I]_{0,1} < [I]_{0,2} < [I]_{0,3}$. Остальные точки при полном неконкурентном ингибировании пересекутся в точке *отсечения константы Михаэлиса* ($-1/K_M$). А пойдут прямые? **Чем больше концентрация ингибитора, тем меньше будет наблюдаемая скорость и V_{max} . А чем меньше V_{max} , тем больше $1/V_{max}$.** То есть в этом случае увеличение концентрации ингибитора приводит к пучку прямых, идущих против часовой стрелки.

Осталось найти истинные константы. Мы меряем V_{max} (каж. для всех I), которые можно превратить в K -каталитические (каж.), если поделить на E_0 .

$$\frac{V_{max}[S]_0}{K_S + [S]_0} = \frac{K - \text{кат. (каж.) } [E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0}$$

Мы намеряли кажущихся каталитических констант. Теперь надо записать, чему они равны:

$$K - \text{кат. (каж.)} = \frac{K_2}{1 + \frac{[I]_0}{K_I}}$$

Ясно, что здесь *нет линейной* зависимости, поэтому надо придумывать какие-то координаты для этого перехода. Первое, что приходит в голову:

$$\frac{1}{K - \text{кат. (каж.)}} = \frac{1}{K_2} + \frac{[I]_0}{K_1 K_2}$$

Сразу видно, что надо работать в *полу-обратных координатах*, то есть строить $1/K$ -кат. (каж.) от I_0 . Тогда график зависимости будет показывать, что **если коэффициент больше 1, значит прямая возрастает. Кроме того, если $1/K(2)$ больше 0, значит прямая приподнята над началом координатной.**

Получается, что $I_0 = 1/K(i)$. Единицу перенесли как -1, умножив на $K(i)$. Получается, что $I_0 = -K(i)$. А $K(s)$ находится практически сразу из двойных обратных координат.

А откуда мы находим кажущиеся каталитические константы? В *квазиравновесном приближении* K_m (каж.) = $K(s)$. Они все сходятся в *точке константы Михаэлиса*. Вся разница между K_m и $K(s)$ в том, что **K_m** учитывает ещё *второй маршрут*. Потому что $K(s) = K(-1)/K(2)$, а $K_m = K(-1)+K(2)/K(1)$.

Мы брали *разные концентрации* субстрата (в трёх сериях эксперимента). Соответственно, мы получаем разные точки $1/[S]$. Ранее мы получили график в *прямых координатах* (отражающий отношение V_0 к S_0). Мы говорили, что современные компьютеры позволяют хорошо рассчитывать *нелинейные регрессии*.

Но всегда надо иметь надёжный способ проверки. Поэтому предложены методы **линеаризации**. Самый распространённый из них - метод обратных координат, благодаря которому на графике мы получаем линию. При этом пересечение с осью *абсцисс* - это - $1/K_m$, а пересечение с осью *ординат* - это $-1/V_{max}$.

В случае, когда ингибитор и субстрат конкурируют за единственное место посадки, у нас все прямые (*3 прямые*) пересекаются на оси *ординат*, потому что у них связывания разные при одинаковом катализе (при **полном конкурентном ингибировании**). А в случае **полного неконкурентного ингибирования субстрат никак не затрагивается**, и все прямые пересекаются в отрицательной *точке константы Михаэлиса*.

Лекция 13. Разбор задач. Посттрансляционные модификации.

Разбор первой задачи

Итак, у нас есть $D \rightleftharpoons 2M$. Польза для науки в том, что стандартные условия и величины – это одно, а реальное положение дел – это иное.

Так вот, провели некий эксперимент и обнаружили, что концентрации D и M (мономера и димера) равны и составляют:

$$[D] = [M] = 1 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$$

Необходимо определить равновесные стандартных параметров, при прочих равных и одномолярных исходных концентрациях, и рассчитать ΔG стандартное. Что касается нахождения концентрации, первое, что нужно было сделать - это записать уравнение:

$$\frac{[M]^2}{[D]} = 1 \cdot 10^{-3}$$

У нас на старте и мономера, и димера *равные* концентрации A дальше можно было либо из двух *мономеров* делать один *димер*, либо из *димера* делать два *мономера*. Наверное, прежде всего надо было бы записать уравнение ($D = M$) в виде: $1 + x = 1 - 2x$. Потому что на один димер тратится два мономера.

Далее создаётся *квадратное* уравнение:

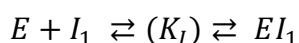
$$\frac{1 - 2x^2}{1 + x} = 1 \cdot 10^{-3}$$

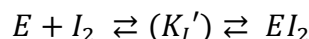
В этом квадратном уравнении *дискриминант* будет где-то в районе 0,0155. И получались два корня: для $D1 = 1.48M$, а для $D2 = 1.52M$. Второй корень ненормальный, потому что больше 1,5 концентрация быть не может. Ведь из одного моля мономера может получиться не более 0,5 моля димера. То есть $[M] = 0,04M$.

Всегда, когда мы оперируем значениями, измеренными в *стандартных* условиях (говоря о биохимических процессах), следует быть очень аккуратными и помнить, что в *организме* эти условия *редко* приближены к стандартным.

Разбор второй задачи

Нам дано:





Обращаю внимание, что у нас есть EI(1) и EI(2). Уравнение *материального баланса* мы записывать не будем. Здесь в качестве частиц могут присутствовать E, ES, EI(1), EI(2). У нас, таким образом, *четыре неизвестных*, и три приходят из констант. И далее мы должны были расписать эти уравнения.

Правильный ответ будет таковым: так как в конкурентном ингибировании в числителе вообще ничего не меняется, мы получаем

$$V_0 = \frac{K_2[E]_0[S]_0}{[S]_0 + K_s(1 + \frac{[I_1]_0}{K_I} + \frac{[I_2]_0}{K_I'})}$$

Дальше многие правильно отметили, что в координатах от $1/V_0$ до $1/[S]_0$ будет пучок прямых, которые пересекаются при одинаковой V_{max} выше координатной по оси ординат. Отрицательный отрезок обозначается K_m (каж.), и она будет равна

$$K_m \text{ (каж.)} = K_s + \frac{K_s}{K_I} [I_1]_0 + \frac{K_s}{K_I'} [I_2]_0$$

Можно либо вообще рассмотреть систему с *одним ингибитором* (скажем, $I_2=0$) и просто рассматривать стандартную ситуацию, находить $K(i)$, либо с другим, и тогда находим $K(i')$. В любом случае делается график зависимости $K(i)$ (каж.) от $I(1)_0$. В этой ситуации получается, что прямая будет *восходящей* и проходить *выше координатной*.

$$K_m \text{ (каж.)} = K_s(1 + \frac{[I_2]_0}{K_I'})$$

Если мы возьмём это равным 0, то будет просто $K(s)$. *Тангенс угла наклона* будет равен $K(s) / K(i)$. Далее мы сможем найти все параметры.

Посттрансляционная модификация белка

Мы не успели разобрать **посттрансляционную модификацию**, поэтому третья задача получилась по материалу, который вы пока не успели освоить. Я естественно не оценивал её в полной мере. Поэтому сначала сделаю ряд замечаний к вашим ответам, а затем мы разберём отдельно эту тему.

Во-первых, солевой мостик не относится к **посттрансляционной** модификации (подразумевающей *ковалентное* взаимодействие). Но солевой мостик является элементом *сворачивания*, то есть *невалентное* взаимодействие.

После того, как белок синтезировался, он сворачивается в полипептид и часто подвергается *модификации (процессингу)*. Иногда модификация бывает **котрансляционная** (когда белок начинает модифицироваться в процессе трансляции).

Посттрансляционная модификация - это любое изменение системы ковалентных связей в синтезированном полипептиде.

Вообще, с белками может происходить что угодно. Однако, у *бактерий* нет тех механизмов, которые важны для класса эукариот. У *растений* и *животных* модификации могут быть самые разные:

1. Гидролиз пептидной связи.

Когда мы говорили об уровне глобулярного белка, мы описывали структуру *химотрипсина*. Мы пришли к пониманию, что далеко не все белки можно готовить в *активной* форме. Многие из них получаются в виде *зимогенов* или *проферментов*, и именно в таком виде они сворачиваются, а потом, когда они попадают к месту работы, происходит их *активация*. Эта активация очень часто идёт путём гидролиза, и выщепляется некоторое количество *олигопептидов* (немного). И в результате происходит **конформационная перестройка**, часто с образованием солевого мостика.

Когда происходит **гидролиз пептидной связи**, не очень далеко друг от друга возникают дополнительные *отрицательно* и *положительно заряженные* группы. Следовательно, увеличивается вероятность возникновения солевого мостика. Обычно это изменение (переход в активную форму) закрепляется соевым мостиком.

Попробуем вспомнить *инсулин*:

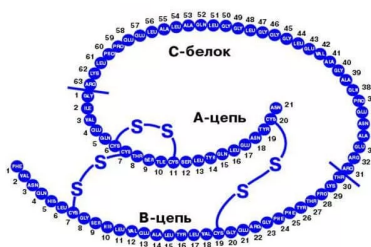


Рис. 13.1. Инсулин

Инсулин - это *гормон* полипептидной природы. В свином инсулине в начале цепи 23 кусочка полипептидных остатков. Он нужен тогда, когда в крови растёт концентрация глюкозы.

В ответ на это начинается вырабатываться инсулин, запускающий стимуляцию *расщепления глюкозы* до более простых форм, а также её запасание в виде *гликогена*. Но в норме концентрация инсулина должна быть *невысокой*.

Синтез по требованию будет занимать довольно *много времени*, поэтому инсулин синтезируется и хранится в депо в виде сначала **препроинсулина**, а затем уходит кусочек пре- (который служит для того, чтобы доставить инсулин в нужное место - в поджелудочную железу). Что интересно, поджелудочная железа имеет два типа тканей: *экзокринная* (наружная) и *эндокринная* (часть *эндокринной системы*, где синтезируются разные аналогичные гормоны, такие как *глюкагон*).

Проинсулин хранится до тех пор, пока не придёт сигнал о повышении глюкозного баланса. Но интересно, что здесь увеличиваются *дисульфидные* связи. На этой А-цепи 30

остатков. а на В-цепи 21 остаток. А вырезается и уходит С-пептид, имеющий 30 остатков. Иными словами, *активная* форма составляет *51 аминокислотный остаток*. Если есть вещества белковой или полипептидной природы, которые не могут всегда присутствовать в активной форме (но могут срочно понадобится), то имеет смысл создавать их в виде *проферментов* или *прогормонов*.

2. S-S мостики.

S-S мостики образуются в результате **окислительно-восстановительной** реакции, если встречаются *два боковых заместителя*, принадлежащих разным *цистеинам*. Тогда происходит образование *остатков цистина* (то есть *цистин* - это такая аминокислота, у которой два остова: CH₂ и S-S). Энергия образования *солевого мостика* равна примерно -5 Ккал / моль, то есть по энергетике они очень близки.

Зачем нужны дисульфидные мостики? Во-первых, это даёт дополнительные связи, которые *стабилизируют структуру* белка. Белок сворачивается в какую-то конформацию, возникают эти связи, и *энергия падает*, стабилизируя систему. Во-вторых, чтобы как-то *защитить белковую группу* от остатков цистеина.

Наверное, ещё стоит сказать, что ферменты делятся на несколько групп:

- 1) если фермент синтезировался и продолжает работать *внутри клетки*, то он называется **внутриклеточным**.
- 2) если фермент работает в *мембране*, то он называется **мембранным**:
 - **Интегральным**. Он держится в мембране за счёт гидрофобных взаимодействий между длинными *неполярными хвостами липидов* и *неполярными аминокислотными остатками*, выходящими наружу. такой белок полностью пронизывает би-слой.
 - **Периферическим**. Такой белок, который держится за счёт гидрофобных взаимодействий, но они утоплены в мембрану лишь *частично*.
 - **Поверхностным**. Такие белки взаимодействуют с полярными головами при посредстве *электростатической* связи. Здесь всё зависит от заряженности голов.

Если организм создаёт секретируемый белок, то это выполняет определённую функцию. Но белок нужно сделать максимально *стабильным*, поскольку организм не сможет контролировать его качество на выходе из организма. Примером является *змеиный яд*. Яд в значительной степени содержит *протеазы*, которые разлагают белки. Соответственно, требуется много *дисульфидных мостиков*, чтобы протеазы были стабильными, и яд был эффективным.

Для образования солевых мостиков нужен *окислительно-восстановительный потенциал*. Он создаётся разными системами, но самые частые - *глутатионовые*. **Глутатион** - это *трипептид*, который состоит из *глутаминовой кислоты, цистеина* и

глицина. Глутатион может существовать как в *окисленной*, так и в *восстановленной* форме. Когда образуется дисульфидный мостик в белке, глутатион *восстанавливается*. А дальше идёт его окисление с задействованием НАДФ или чего-то ещё. Другим вариантом является белок **тиоредоксин**, на котором мостик наоборот преобразуется в SH-группу.

3) Гликозилирование.

Это **модификация белка углеводами** (чаще всего *линейными* или *разветвлёнными* олигосахаридами). Есть три разных сущности, в которых есть и белок, и углеводы. С двумя из них мы уже знакомы. Во-первых, это *пептидогликан* бактериальной клеточной стенки, в котором длинные *полимерные* цепочки подвязаны *олигопептидами* (чаще тетра-, пента-, и гекса-). Во-вторых, это *протеогликановый агрегат* (имеющий в составе гиалуронат, хондроитинсульфат), который является основным компонентом *хрящей* (соотношение белка к углеводам в нём 5% на 95%).

Попутно заметим, что в составе хрящевых белков очень много гидрофильных групп, поэтому он имеет гелеобразную текстуру. В-третьих, это *гликопротеины*, в которых соотношение белков к углеводам в пользу белка (около 66% на 33% по массе). Надо заметить, что очень многие белки являются гликопротеинами (особенно, среди *растительных*, для которых велика роль *фотосинтеза*).

Очень многие *животные* белки тоже являются гликопротеинами. То есть, они после синтеза сразу попадают в так называемый *эндоплазматический ретикулум*, где происходит **посттрансляционное гликозилирование**. Разница в том, что в белках *животной* природы углеводов в среднем 5%, а в *растительных* - уже около 1/3 массы.

Мы вспоминали *гликопротеины*. Когда мы окисляли *перидатом* углеводы. Повторим, что очень часто антитела для проведения *иммуноферментного анализа* требуют *конъюгата* между иммунными телами и ферментами.

В качестве фермента чаще всего берётся пероксидаза. Чтобы не затрагивать *аминокислотную часть* антитела (не испортить *центр связывания*), исследователи часто в качестве "мишени" выбирают *углеводную часть* (порядка 5% от общей массы). Если правильно подобрать концентрацию, можно получить *карбонильные группы*, которые затем *конъюгируют* с пероксидазой (что даёт необходимый конъюгат).

Если говорить о *пероксидазе*, то в много-углеводных белках углеводная оболочка снаружи нужна для придания правильной *растворимости*. Вообще, пероксидаза полезна для проведения всяческих *медицинских тестов*. Откуда её выделяют? Её много в хрене. А в Мексике её получают из жгучего перца. Когда началась эпоха промышленного использования тест-систем, придумали более лёгкий метод: можно взять *бактерии*, в которых есть маленькие *кольцевые ДНК (плазмиды)*. Соответственно, если взять *ген*, кодирующий пероксидазу и вставить его в плазмиду (сделав правильную последовательность перед геном, которая позволит ввести промоутер), то пойдёт *синтез белка*.

Но есть одна проблема: дело в том, что в бактериях отсутствует *посттрансляционная модификация* с помощью системы *гликозилирования*. В результате получается не гликопротеин, а просто белковая часть. В водной среде бактерии он *агрегирует*, потому что там много *неполярных* заместителей. Получаются странные сущности, которые называются “*включённые тела*”. Как получить работающую пероксидазу? Это ведь не просто белок и не просто гликопротеин. В её активном центре находится ген (порфириновое кольцо с железом, которое надо правильно встроить).

Поэтому дальше необходимо подавить гидрофобное взаимодействие с помощью мочевины. Причём, концентрацию мочевины следует довести до 6-8 моль / литр. В этом “контейнере” плавают много мочевины и индивидуальные цепочки белка, которые нужно собрать. Далее задача состоит в том, чтобы постепенно *снижать концентрацию* мочевины (например, с помощью *диализа*), собирая белки, и правильно встроить в него *ген*. При этом, нужно добавить некий *стабилизатор* (монит, сорбит), чтобы белок не слипся. На выходе получается максимум 20% функционирующей *пероксидазы*.

Отдельно скажем, что гликозилирование может идти по определённым группам: может возникать *O-гликозидная* и *N-гликозидная* связь.

4. Модификация N-конца.

Напоминаем себе, что у полипептидов есть *C-конец* и *N-конец*. А также вспоминаем *эндо-* и *экзо-протеазы*, которые *специфичны* к концам. Есть, соответственно, *аминопептидазы* и *карбоксипептидазы*. От первых иногда требуется *защита*, поэтому далеко не всегда N-конец является свободным. Поэтому требуется *ацилирование N-конца* (*ацетилирование*). Если пропионовые (масляные) кислоты - это редкие случаи для организма, то *муравьиная* и *уксусная* кислоты - более распространённый случай.

5. Модификация C-конца.

Иногда точно также требуется *защита* от *карбоксипептидаз*. В этом случае чаще всего C-концевая группа превращается в *амид*. То есть, вместо COH на конце CONH_2 .

6. Фосфорилирование.

Очень часто регуляция ферментов осуществляется через *фосфорилирование* и *дефосфорилирование* остатков *сирина*. Иногда это происходит через *гистидин*. Первый пример - *гликогенфосфоорилаза*.

7. Здесь, наверное, можно поставить многоточие, поскольку ещё **много модификаций** существует у белков.

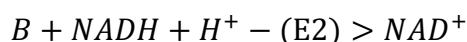
Есть *коферменты* и *кофакторы*, которые выступают зачастую вторыми субстратами. Если что-то окисляется, то что-то должно восстанавливаться. Если мы переносим *ацильную* группу, то мы забираем её с *одного* субстрата и переносим на *другой* субстрат все *трансферазные* реакции. **Коферменты** и **кофакторы** - это вещества разной степени сложности, чаще всего *водорастворимые витамины*.

Коферменты и кофакторы можно *классифицировать* по-разному. В одном случае у кофермента может быть *отдельный сайт посадки* (и тогда он кофактор). В другом случае там уже сидит *кофермент*, и поэтому *кофактор* - это *наконечник активного центра*, который на него действует. Но не всё так просто. Принято считать, что *кофермент* связан *невалентным* взаимодействием, а *кофактор* связан чаще всего *ковалентной* связью. Наверное, можно говорить, что всё определяется константой связывания: **если константа связывания говорит, что вещество-помощник может ассоциировать или диссоциировать (не требуя высоких энергозатрат), то это будет кофермент; а если оно связано очень прочно, и диссоциация мала, а ассоциация велика, то это будет кофактор.**

Кофермент — это вещество, которое участвует в одном каталитическом акте на одной белковой молекуле, а затем уходит в изменённой форме к другому сопряжённому процессу, чтобы вернуться в исходное состояние.

Например, *дегидрогеназная реакция*: $AH_2 + NAD^+ - (E) > A + NADH + H^+$

НАД связывается с ферментом в окисленной форме, восстанавливается и уходит. Он ищет сопряжённый процесс В, где есть другой фермент E2, который обеспечит возвращение НАД в исходную окисленную форму.



То есть, одна реакция происходит с *одним* ферментом, а другая - с *другим*. В данном случае НАД - это *кофермент*.

А *кофактор* никуда не бежит, но проводит весь цикл с *одной и той же* белковой глобулой. Фактически такую же реакцию, как мы только что записали, катализирует *флаavin-аденин-нуклеотид* ($E - FAD$).

Лекция 14. Сворачивание белков.

Мы разобрали уровни **структурной организации белков**. Но мы пока ещё не говорили о том, *как же эти структуры образуются*, и как протекает этот процесс.

Исторические этапы изучения сворачивания

Где происходит сворачивание? Оно может протекать **in vivo** и **in vitro**. В первом случае сворачивание проходит в составе *живой* клетки. Со временем встал вопрос о том, как протекает сворачивание белка в пробирке в лаборатории. Это значительно легче исследовать. Подходов к изучению этого процесса множество.

Это и *спектральные* методы, и *антитела*, специфичные к тому или иному типу конформации. Возникают также различные методы, связанные с *протеолизом*. Это предполагает на разной стадии сворачивания белков использовать разные *специфичные протеазы*, которые гидролизуют разные пептидные связи и смотреть, какие в том или ином случае будут получаться фрагменты.

Хотя сворачивание - сложный процесс, тем не менее изучать его легче, чем процесс сворачивания, происходящий в живых организмах. Зачем его изучать?

- Познавательный аспект: интересно знать, как устроены живые существа;
- Прикладной аспект: есть ряд заболеваний, которые связаны с неправильным сворачиванием белков (нарушения аминокислотной последовательности) в самых разных вариантах => нужно уметь определять их и исправлять;
- Биотехнологический аспект: рассмотрение оптимальных систем в природе, чтобы создать на их основе системы, применимые промышленно.

Если говорить о сворачивании белков **инвитро** (о биотехнологиях), то это разнообразные применения, связанные с тонким *органическим синтезом*. Белки и антитела используются в самых разных областях.

Имела место историческая дискуссия, которая развернулась вокруг того, как разворачиваются белки: *самопроизвольно* или *несамопроизвольно*. В рамках этого спора происходила реинкарнация витализма. Некоторые утверждали, что для сворачивания белка необходим *некий неизвестный элемент*. Другие утверждали, что сворачивание белков - *термодинамически выгодный процесс*, и всё это описывается физико-химическими законами.

Как велись исследования? Сторонники научного подхода пытались *обратно развернуть белок*: убрать раздражающие воздействия и посмотреть, свернётся он обратно или нет. Таких работ довольно много, но всегда находилось сомнение, что белок был *развёрнут не полностью*, иначе бы повторное сворачивание не сработало.

Промежуточный итог был поставлен в 1970-е годы, когда в лаборатории *Института белка в Пуццино* химическими методами *синтезировали рибонуклеазу* из 72 аминокислотных остатков, и она свернулась в исходную *природную конформацию*.

Итак, мы должны зафиксировать, что **сворачивание белка термодинамически выгодно**, значит происходит **самопроизвольно**. Белку нативной конформации соответствует *минимум потенциальной поверхности* (то есть белок одного и того же типа сворачивается всегда в *одну и ту же конформацию*). В клетке среда более менее постоянна, но в пробирке при изменении среды конформация может видоизменяться. Когда мы сворачиваем белок в *лаборатории*, наша задача - получить что-то *работающее*, поэтому и там выгодно обеспечить сворачивание в одну и ту же форму.

Конформация, соответствующая минимуму, называется **нативной**. Соответственно, мы установили, что сворачивание белка идёт со снижением дельта G:

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

Что же происходит при сворачивании?

Сворачивание в вакуумных модельных системах

При сворачивании полипептидной цепочки мы переходим к более *упорядоченной* системе. То есть, с точки зрения *термодинамики*, сворачивание *не выгодно*. Это потери, которые должны быть компенсированы. Чтобы оценить потери, можно привлечь статистическую термодинамику и сказать, что **энтропия равна газовой постоянной, умноженной на логарифм вероятности возникновения данной конформации**.

$$S = R \cdot \ln W = R \ln \frac{W_N}{W_U} = R \ln \frac{1}{10}$$

При сворачивании мы будем рассматривать две конформации: *нативную* (native) и *развёрнутую* (unfolded) для которых уравнение будет соответственно

$$\Delta S = S_N - S_U \quad \text{при 100 аминокислотных остатках.}$$

Далее мы берём в вакууме систему из 100 остатков и попробуем скрутить её в спираль (*альфа-спираль*). Здесь важно также вспомнить *карту Рамачандрана* для среднестатистического белка. Где-то в районе 60/-60 у нас облачко для альфа-спирали. То есть, для альфа спирали возможно примерно 10% углов. Тогда

$$\Delta S = R \ln W_N - R \ln W_U = R \ln \frac{W_N}{W_U} = \frac{1}{10}$$

Теперь мы должны пробежаться от 1 до 100:

$$\Delta S = \sum_{i=1}^{100} R \ln W_i = \sum_{i=1}^{100} R \ln \left(\frac{1}{10}\right)^{100} = -0,46 \frac{\text{Ккал}}{\text{моль} \cdot \text{К}}$$

Тогда при $t = 310$ градусов

$$\Delta G = \Delta H + 143 \frac{\text{Ккал}}{\text{моль}}$$

Так как мы перешли к более *упорядоченной* системе, ΔG должно *вырасти*. Двигаемся дальше, переходя от полностью *свёрнутой* конформации к *нативной*.

В нашем модельном случае мы компенсируем 143 Ккал/моль. Это альфа-спираль, а значит там возникают *водородные* связи. Водородная связь равна примерно -3 Ккал/моль. Вклад от водородных связей в целом будет около -300 Ккал/моль. Главное для нас, что мы за счёт водородных связей с запасом компенсируем энтропийные потери. Мы подтвердили тот факт, что **энтропийные потери при сворачивании полипептидной цепи компенсируются за счёт энергии невалентных взаимодействий**.

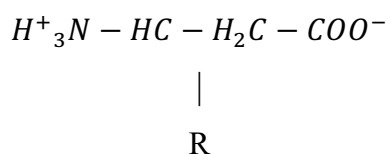
Теперь давайте поймём, что это *модельная* система, и в реальных *глобулярных* белках не бывает ситуации, когда все 100% водородных связей - в *альфа-спирали*. Там их не более 20%. Но у нас есть и другие типы взаимодействия (в первую очередь, *гидрофобное взаимодействие*), которые тоже вносят свой вклад в *компенсацию* энтропийных потерь.

Получается, что у нас в целом сворачивание термодинамически выгодно. Таким образом, при переходе от *статистического* клубка белка к *свёрнутой* конформации, индивидуальные вклады *огромны*. А вот их *равнодействующая* (ΔG *стабилизации*) оказывается для белков совсем *невелика*:

$$\Delta G_{\text{стаб.}} = -5 \div 15 \frac{\text{Ккал}}{\text{моль}}$$

Поэтому белки называют *сбалансированными* структуры, и поэтому они так *лабильны* в различных условиях. Что может произойти при ухудшении условий? Белки очень чувствительны к температуре. Представьте, что будет не 310, а 350 градусов. Тогда уже может не хватить *невалентных* взаимодействий для *компенсации* энтропийных издержек. При $\Delta G > 0$ белок просто *перестанет сворачиваться*, а если был *свёрнут*, то *распадётся*.

Ещё иногда обсуждается вопрос о том, почему бы не построить мир из остатков *бета-аминокислот*. Тогда бы добавилась ещё одна связь C-C.



В этой ситуации добавился бы элемент гибкости, и 1/10 превратилась бы в 3/1000, то есть *вероятность* возникновения альфа-спирали существенно бы сократилась. Я это к тому, что белки в природе построены очень *оптимальным* образом.

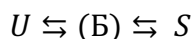
Синтез полипептидной цепочки - это энергозатратный процесс. Но когда цепочка уже синтезирована, её дальнейшее **сворачивание** становится термодинамически выгодным. Если это так, то почему возникают *in vitro* *проблемы* при сворачивании? Значит, дело в кинетике сворачивания. Есть скорость-лимитирующие

стадии. А когда мы проводим эксперимент в *лаборатории*, у нас нет возможности воспроизвести все *условия*, которые имеют место в среде *in vivo*.

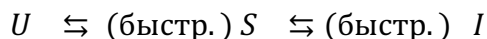
Кинетика сворачивания

Начинать этот раздел мы будем с **общей кинетической схемы**. Когда сворачивается белок, есть огромное количество *промежуточных конформаций*. Все их мы *отследить* не можем, поэтому надо рассматривать только ключевые стадии:

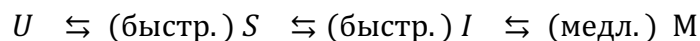
Стартуем мы с полностью развёрнутого *S статистического белкового клубка* (не все углы возможны, в силу *жёсткой* структуры белка).



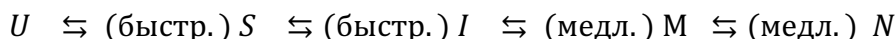
Происходит образование вторичных структур. Если они в принципе должны быть, то они образуются первыми, причём довольно быстро. Далее относительно быстро происходит образование конформаций I (так называемый *липкий интермедиат*).



Далее медленно образуется конформация, которую называют M (*расплавленной глобулой*):



От M конформация переходит к N (*нативной*).



При этом на стадии I фактически наступает необратимость A (*агрегата белка*) в условиях эксперимента. Теперь давайте посмотрим, что происходит согласно этой схеме. Образовываются *третичные* структуры, и многие остатки идут внутрь. Но в *липком интермедиате* белок частично свёрнут, и много *неполярных остатков*, которые в конечном счёте должны оказаться внутри, всё ещё находятся *снаружи*. А что с ними происходит в водной среде? Они *склеиваются* (отсюда и название “липкий”, что обозначает *склонность к агрегации*).

Что такое M? Это конформация, в которой *все боковые заместители*, которые должны быть внутри, *оказались внутри*. Но они *не идеально расположены* относительно друг друга (ещё не вся *вода* вытеснена). Соответственно, объём занимаемый M пока *больше*, чем должен быть конечный объём N (нативной конформации), то есть глобула как-будто “плавится” (отсюда название - “*расплавленная*”).

Окончательная *компактизация* происходит медленно, и мы переходим к *нативной* конформации (N). То, что исходно возникают вторичные структуры, было показано, в частности, с помощью *дейтерированной воды*. Берётся *развёрнутый* белок, обыкновенная вода меняется (даём N свернуться), но через короткое время обратно вводим его снова в обычную воду, и у нас снова происходит *обмен*. Метка остаётся только там, где есть *водородные* связи. Там, где их нет, происходит замена. Было показано, что для белков, у которых *остаётся* часть вторичных структур, дейтерий

остаётся, а для белков, у которых вторичных структур *нет*, дейтерия тоже *не остаётся*. Из этого был сделан вывод об исходности вторичных структур.

Это, в общем-то, логично, поскольку перед тем, как всё сворачивается в глобулу, поджимаясь и компактизуясь, надо сделать какие-то элементы (спиральные или листовые), потому что потом настраивать их будет гораздо тяжелее (исходя из того, что соседние аминокислоты будут толкать друг друга в цепи).

Это общая схема, но если посмотреть более детально, то мы обнаружим некоторые скорость лимитирующие стадии (*относительные* величины). В каждом случае они будут свои, но общие наблюдения имеют место.

1. **Мультидоменные белки** => “Притирка” доменов. Домены, как области глобулярности, уже образовались, и идёт притирка.
2. **Монодоменные белки** => цис-транс у пролина.

У рибонуклеазы $\frac{1}{3}$ цепей *быстросворачиваемые*, а $\frac{2}{3}$ *медленносворачиваемые*. Стали смотреть, в чём же дело, и обнаружили в аминокислотном составе много *пролина*. Одно из следствий его *жёсткости* - *близкое* расположение *цис-* и *транс-*, а с другой стороны, у него не такой высокий переходный барьер. То есть, если для другой аминокислоты это примерно 20 Ккал/моль, для *пролина* будет 13 Ккал/моль (существенно меньше). Для другой пептидной связи образуется *транс-*, то для *пролина* возможен *переход к цис-*. В его случае примерно *половина* пептидной связи в *цис-форме*, а другая - в *транс-форме*.

Выдвигалось предположение, что *медленносворачиваемые* цепи происходят из-за *неправильного соотношения* *цис-* и *транс-* форм. При правильном соотношении схлопывание происходит довольно быстро. Однако, всё это наблюдалось в пробирке. А в природе такое не наблюдалось. Таким образом, предположили, что *in vivo* сворачиванию помогает некий *фермент*. Нашли такой: *пептидил-пролил-цис/транс-изомераза*. Если его добавить в пробирку, то медленно сворачиваемых цепей не останется.

Естественно, фермент не знает правильной комбинации *цис-* *транс-* комбинации *пролина*. Но фермент *снижает энергию активации* и *ускоряет перебор* вариантов при сворачивании. Принято считать, что этот фермент стабилизирует переходное состояние.

3. **Система С-С мостиков** => Бычий панкреатический ингибитор трипсина (ВРТИ).

Мы помним, что *дисульфидные мостики* есть не у всех белков, но когда они есть, и их больше, чем один, то возникает набор разных комбинаций.

Мы также говорили, что ферменты в организме *включаются / выключаются* по требованию, в остальное время находясь в *неактивном* состоянии. При этом за активацию отвечают ингибиторы, которые могут быть *низкомолекулярными* (а зачастую это белки). У ВРТИ есть шесть остатков *цистеина*, соответственно, *три С-С мостика*.

Если у нас есть шесть точек, каким количеством *линий* максимально их можно связать? Это определяется по формуле:

$$\frac{n(n-1)}{2}$$

В данном случае у нас может потенциально возникнуть 15 мостиков (больше трёх). А нам нужны *три* правильных мостика для образования системы. Порядковые номера цистеина с N-конца таковы: 5, 14, 30, 38, 51, 55. С точки зрения мостиков есть структура, которая *развёрнута*.

Чтобы образовался *дисульфидный мостик*, необходимо, чтобы участники были *пространственно сближены*. Образуются структуры Ia и Ib. Сразу выпишем пары, образующие *правильные мостики*: 30-51, 5-55, 14-38. Так вот, рядом оказались три остатка (5, 30 и 51): в структуре Ia образуется правильный мостик 30-51, а в структуре Ib - неправильный мостик 5-30. Это заняло около 1 миллисекунды. Первый вывод, который мы можем сделать: **для сворачивания критически важно образование первого правильного дисульфидного мостика.**

В структуре **Ib** далее ничего не пойдёт. Если вдруг он бы образовался, то единственный вариант - разрушить его и отправиться по *правильному* пути строения. Ещё один важный момент состоит в том, что введённые ранее конформации **S, M, I, N** - это не одиночные формы, а **группы конформаций**. То есть, мы находимся в стадии M, и происходит *множество под-стадий* при переходе к N. Эта схема является масштабированием последовательности событий.

Итак, на данном этапе, чтобы глобула образовалась в дальнейшем, критически важно образование *правильного мостика*. Далее образуется **структура два II** (опять же в двух вариантах):

- 1) $II_A \frac{30-51}{5-14} + II_B \frac{30-51}{5-38}$ (оба неправильные).
- 2) $II_C \frac{30-51}{14-38}$ (правильный мостик).

Правильный мостик 14-38 образовался *преждевременно*, поэтому дальше с **IIc** ничего не произойдёт, и он должен *вернуться* к одной из двух других структур. *Промежуточные* структуры предполагают, что могут образовываться одновременно правильные и неправильные мостики. Эта стадия также заняла около 1 миллисекунды.

А вот дальше наступает ещё одна важная **стадия - третья (III)**, на которой требуется образование ещё одного правильного мостика. Здесь время уже равняется 13 секундам. Соответственно, происходят ещё процессы, которые обеспечивают *подбор правильного мостика*:

$$III \frac{30-51}{5-51}$$

Обратите внимание, что нам понадобилась *промежуточная* стадия в виде *неправильных* подборов (5-14, 5-38), чтобы потом смогла встать вместе *правильная* пара 5-38.

Всё завершает быстрая **стадия IV**, которая занимает 12 миллисекунд, и в которой есть все правильные мостики: 30-51, 5-55, 14-38. То есть, всё должно подгоняться своевременно и скоординированно.

Ещё хочется сказать здесь, что методы, которые позволили выявить эти данные, являются *базовыми* и были установлены ещё в XX веке. Постоянно появляются и новые методы позволяют найти *новые свойства* и охарактеризовать их, но не позволяют радикально перевернуть заложенные основы.

И последний интересный момент: сайты, *доступные* для протеолиза. Мы берём *частично свёрнутые белки* и обрабатываем их *протеазами* в какой-то концентрации. И дальше смотрим, на какие куски белки *распадаются*. В этих кусках мы уже сможем выяснить, какие *аминокислотные остатки* остались. Но для этого нужна возможность секвенирования (то есть **определения последовательности белков или нуклеиновых кислот**).

Лекция 15. Сворачивание белков (окончание).

Мы с вами рассматривали *стадии сворачивания* белка. Мы также рассмотрели *скорость лимитирующие* этапы. Однодоменные структуры сворачиваются относительно быстро, но даже внутри них должны быть *лимитирующие стадии*. Кроме того, мы рассмотрели систему установления правильных *цис- транс-* изомерных форм у остатков *цистеина*, установив, что в каждом конкретном положении должна быть только *одна* из форм в правильной конфигурации (*in vitro*).

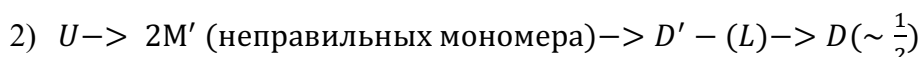
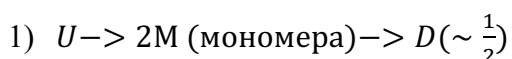
Далее мы посмотрели, что бывает с *сульфидными мостиками* и установили параметры для образования их *правильных* конфигураций. При этом очень важно образование первого правильного дисульфидного мостика, который сближает *необходимые участки* завязки полипептидной цепочки. На временных стадиях возможно образование *неправильных* мостиков, поэтому для ВРТИ важно также образование *второго правильного* мостика, после чего дальнейший процесс *ускоряется*.

Опять же, надо сказать, что основные проблемы наблюдаются *in vitro*, в то время как *in vivo* они отсутствуют. Поиск фермента позволил обнаружить широко распространённую в разных тканях *протеин-дисульфид-изомеразу* (которая определённым образом *ускоряет перебор* вариантов для образования мостиков). Он добавляется к белку, который испытывает *проблемы* с образованием дисульфидных мостиков, и *налаживает* этот процесс.

1. **Мультидоменные белки** => “Притирка” доменов: домены, то есть области глобулярности, уже образовались, и идёт притирка.
2. **Монодоменные белки** => цис-транс у пролина.
3. **Система С-С мостиков** => Бычий панкреатический ингибитор трипсина (ВРТИ).
4. **Олигомерные белки** => сворачивание субъединиц происходит быстро, время уходит на “притирку”.

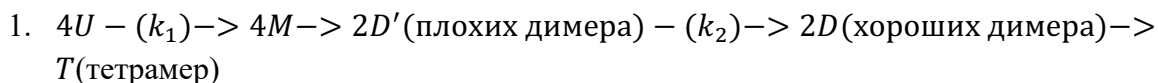
Как в случае доменов, с субъединицами также случается притирка. Но так бывает не всегда. В первом примере мы возьмём *малатдегидрогеназу* (малат-ДН). Этот фермент обратимо катализирует *окислительно-восстановительную* реакцию между *малатом* и *оксалоацетатом* (анионом яблочной кислоты). И та, и другая кислоты являются дикарбоновыми (малат - это альфа-гидрокси-группа, в то время как оксалоацетат - это альфа-кето-группа).

ДН является *димером*, поэтому для него возможны два пути:



Как ни странно, процесс сворачивания протекает двояко. Мы говорили, что обычно всё сворачивается в одну и ту же структуру. Когда речь идёт о большом мономерном белке, это так. Но на уровне субъединиц всё устроено более сложным образом.

Другой пример: лактатдегидрогеназа (лактат-ДН), которая ускоряет реакцию между *виноградной* кислотой и анионом *молочной* кислоты. В этом случае реакция практически та же (*окисление / восстановление* гидроксильной / карбонильной группы). Здесь ситуация идёт следующим образом:



Когда возникает *несколько субъединиц*, практически всегда они сворачиваются качественно и быстро, но всё-таки возможны *разные* варианты.

Ферменты сворачивания

Надо сказать ещё об одном *универсальном* типе белков, которые в принципе можно назвать в широком смысле **ферментами сворачивания**. Речь идёт о **шаперонах** (hsp).

Довольно долго мировое сообщество не знало об их существовании. Потом, при развитии методов наблюдения за белками, было установлено, что если организм подвергается *умеренному тепловому* воздействию, в ответ на это событие начинается наработка белков. Они позволяют *свернуть обратно* в нативную конформацию всё, что можно спасти (ренатурация), а там, где процессы белкового сворачивания необратимы - *разбирают* белки на аминокислоты (heat shock protein).

Продолжительное время считалось, что эти белки существуют только в ответ на вредные воздействия на организм. Впоследствии выяснилось, что они существуют *постоянно*, просто их *концентрация* значительно *меньше*. Тогда они получили название шапероны (от франц. - “покровитель”).

Выяснилось, что есть три разных класса белков-шаперонов:

1. **Stress 70**
2. **Stress 90**
3. **Шаперонины** (hsp 60; hsp 10)

Во-первых, 10, 60, 70, 90 - это величины *молекулярной массы* в килодальтонах. Во-вторых, они действуют на белок в *разных последовательностях* (то есть специфичны к разному состоянию свёрнутости белка).

Первым вступает в дело *stress 70* (несвёрнутый белок). Далее приходят *шаперонины* (частично-свёрнутый белок). А *stress 90* приходит к уже почти готовому белку. Соответственно, у них совсем разные функции и структура.

Начнём со **Stress 70**. Давайте считать, что у него примерно 700 аминокислотных остатков. Он *цепляется* к органелле N-концом. На C-конце находится *центр связывания* субстрата (которым является белок). На N-конце примерно 450 остатков, а на C-конце примерно 250 остатков. Этот домен ещё обладает **АТФ-азной активностью**. Иными словами, что здесь есть центр, который обеспечивает катализ гидролиза АТФ до АДФ и фосфата (с *химической* точки зрения). А с точки зрения *функции*, это значит, что он способен сам снабжать себя энергией.

Ещё важно сказать, что этот домен *консервативен*. Это значит, что у разных белков Stress 70 аминокислотная *последовательность* практически *совпадает* (степень гомологии составляет порядка 95%). Если взять 10 разных шаперонов Stress 70, сняв сиквенс, мы увидим, что в домене N-конца они крайне *схожи*, а с C-концов будут *различия*. Обратим внимание, что C-конец является *субстрат-связывающим*. А что же посередине, между двумя доменами? Там находится участок *чувствительных протеолизом*. Такой шаперон напоминает отвёртку со съёмным наконечником. Когда шаперону нужно подстроиться под тот или иной тип сворачиваемого бела, N-домен можно отщепить и пересобрать C-конец заново (под новый субстрат).

В нашей **общей кинетической схеме** Stress 70 появляется первым на этапе перехода от S к I. Видимо, на первом этапе *водородные связи* настолько сильны (при падении ΔG), что не требуют подключения дополнительных агентов к образованию вторичных структур.

Stress 70 связывается в какой-то точке с определённым субстратом, даёт ему необходимую энергию для связывания, и уходит. Далее, когда структура собрана, в игру вступают *шаперонины*.

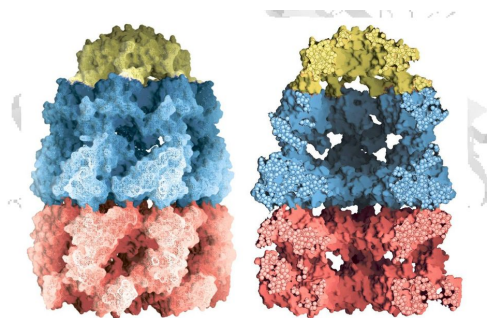


Рис. 15.1. Шаперонины

Шаперонины - это *олигомерные* белки, представленные в виде “бочонок” (GroEL). Как известно, самая опасная с точки зрения сворачивания стадия - это *липкий интермедиат*, поскольку наряду со сворачиванием происходит *агрегирование* белка.

А если мы молекулу поместить в такой бочонок, то агрегация больше не страшна. Там же осуществляются ключевые стадии отправки внутрь всех тех боковых заместителей, которые ещё не успели туда попасть. Составляющие шаперонина - это 14 субъединиц, из которых 10 делают сам бочонок.

У нас остались Stress 90, которые специфичны уже к стадии N. А мы знаем, что очень часто путь от рибосомы до места работы белка не очень близок. Поэтому часто образуется комплекс со Stress 90, который помогает белку вернуться на место локализации в клетке. В целом надо отметить, что сворачивание in vivo (по сравнению с in vitro):

- **Гораздо тяжелее изучать.** Методы существуют, и среди них: *антитела* с разной *специфичностью* к свёрнутости белка; *протеазы*, которые могут *гидролизовать* определённые пептидные связи, обеспечивая *дробление* белка; разнообразные *спектральные* методы.
- **Сворачивание идёт гораздо быстрее.** В основном, за счёт присутствия шаперонов и других фрагментов.
- **Сворачивание протекает с большей эффективностью.** То есть, выход *правильно* собранного белка значительно *выше*, при этом давится путь агрегации за счёт действия шаперонинов.

Шапероны трудно назвать *классическими* ферментами. Гораздо ближе к нему Stress 70, так как у него есть сайт связывания со сворачивающимся белком. А шаперонины - это бочонки (в которых есть множественные слабые контакты, на месте отхода которых происходит сворачивание).

На этом мы заканчиваем тему **сворачивания** и переходим к теме **стабильности**.

Стабильность белков

Белок *синтезируется* в развёрнутом виде и *сворачивается* во что-то. Форма существования белка - это **конформация**. Конформации бывают различные:

1. **Нативные** (природные).
2. **Денатурированные**.

Это термины для обозначения являются, конечно, *неоднозначными*. Проблема в том, что белки изучаются *под разным углом*, и это предполагает сдвиг значений в ту или иную аспектную сторону.

Если мы говорим о стабильности нативной конформации белка X в организме Y (в лаборатории), мы должны *выделить* его. Здесь есть два варианта: либо открыть каталог фирмы, которая его поставляет, либо взять исходный материал и произвести его. Допустим, мы выделили белок. Это нативная конформация?

Есть риск, что были упущены какие-то фазы, и на выходе мы получили белок, который работает, но с *гораздо меньшей эффективностью*, чем *in vivo*.

Наверное, правильно понимать под **нативной** конформацией ту, в которой он существует *в условиях живого организма*. Но такую конформацию трудно увидеть. Поэтому в литературе зачастую нативной обозначается конформация, в которой белок существует в *нейтральных* условиях (при *благоприятных* значениях pH для данного

белка и отсутствии вредных агентов). Допустим, у нас комнатная температура, буферный водный раствор и нейтральное значение рН. Поэтому мы будем считать это *нативной конформацией in vitro*.

Чтобы определить стабильность нативной конформации нам нужно *описать координаты* всех её *атомов*. А далее нужно смотреть во времени за *изменением* этих координат. Скорее всего, в ближайшем будущем это станет рутинной процедурой, и методы позволят *метить отдельные атомы* и *отслеживать* их в высоком разрешении. Пока такой возможности нет, нужен некий метод получения координат:

1. **Рентгеноструктурный анализ.** Необходимо создать *кристалл* фермента и исследовать его. Сегодня это довольно стандартная технология. Однако, во-первых, не все белки хорошо кристаллизуются. Во-вторых, в кристалле белок *лишён подвижности*. Поэтому далеко не факт, что *динамически подвижный* белок кристаллизуется ровно в том виде, в котором он живёт в растворе. К примеру, кристаллическая решётка NaCl и его раствор в воде - разные вещи. Конечно, можно взять *протеолитический* фермент, сделать из него *суспензию*, *диспергировать* её в октане и заняться пептидным синтезом. Но это обеспечит лишь *очень малую* долю активности (которая наблюдается в водной среде).
2. **ЕМР-спектроскопия.** Развитие метода началось с исследования больших *олигопептидов* и шло ко всё более малым белкам. Сейчас этот метод уже более-менее стандартизирован, чтобы с успехом довольно быстро рассматривать *средние* белки. Но есть базовое ограничение: *накопление сигнала*. Получается, что мы не можем получить *мгновенную* картинку положения координат. В разумных пределах это ограничение преодолеть вряд ли получится.

Помимо конформаций белка, можно также говорить о **конформерах** (особенно говоря о функциональных белках). Когда фермент что-то связывает, в нём что-то *меняется*, так же, как и во время протекания реакции. В конечном счёте, после образования продукта фермент возвращается в *исходное* состояние. Эта *подвижность* будет *упущена* при использовании методов ЕМР.

Когда мы переносим белки в разные системы, описание координат всех атомов представляет из себя очень *сложную* задачу. Хорошая новость состоит в том, что все *функциональные* белки очень *хорошо построены*. То есть, чтобы фермент катализировал субстрат, у него должны быть очень *правильно* (с геометрической точки зрения) *расположены* группы в активном центре. Если антитело связывает антиген с высокой константой, то это должно быть очень точно *геометрически организовано*. Поэтому, если что-то происходит с белком, и теряется его *нативная* конформация, то в первую очередь это скажется на его *каталитической активности*. Тогда антитело перестанет связывать антиген, рецептор перестанет узнавать фермент, и т.д.

То есть, сам факт проявления и **уровень функциональной активности** является замечательным *тестом* на *стабильность* белка. Так как мы в большей степени говорим

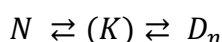
сейчас о *ферментах*, то будем считать, что **сохранение ферментативной активности проверяет уровень стабильности белка**.

Когда чего-то очень много, разумно делать некую *классификацию*. Поэтому я предложу три критерия:

1. **Обратимость**.

Здесь мы будем различать:

1.1. ***Обратимые процессы*** (денатурация). Переход к другой конформации, который, при удалении возбуждающего фактора, возвращает белок в нативную конформацию. Такие конформации мы будем называть D.



При нативных условиях преобладающей является N-конформация, а потом, при соответствующих манипуляциях, более выгодной стала D_n-конформация. Затем мы с помощью диализа убрали соль, и N снова стала преобладать.

1.2. ***Необратимые процессы*** (инактивация). В этом случае что-то случается, и происходит переход N-конформации в I_n-конформацию.



2. **Измеряемые свойства**.

Что можно измерять?

2.1. ***Активность в начальный момент времени*** (при T=0 сек.). Мы создаём некоторое количество разных условий и делаем несколько пробирок.

2.2. ***Стабильность при хранении*** (storage stability).

2.3. ***Операционная стабильность белка***.

3. **Параметры и состав системы**.

Под **системой** в данном случае понимают биокаталитическую систему, в которой пребывает фермент, производящий те или иные действия.

3.3. ***Температура*** (T в градусах Цельсия).

3.3. ***Давление*** (p).

3.3. ***Состав***:

- соли
- органические растворители
- хелатирующие агенты
- детергенты (поверхностно активные вещества образующие мицеллы и другие гексагональные упаковки)
- денатуранты (мочевина, дегуанидин-хлорид) т.д.

Речь идёт, например, о стабильности к действию органических растворителей. При этом, эксперимент может ставиться крайне разнообразно:

- 1) Мы делаем серию пробирок с *разной концентрацией* органического растворителя (0, 10, 20, 30, 40, 50%). Из каждой пробирки в начальный момент времени отбирается проба, добавляется субстрат и измеряется активность (при $T=0$). Скорее всего мы получим график, отражающий стабильность к действию органического растворителя в начальный момент времени.
- 2) Мы берём большие бабды с *большим* количеством раствора (0, 20, 50%), в которых хранится белок. Через определённые промежутки времени берутся пробы, и при добавлении субстрата измеряется активность. Тогда мы получим график, отражающий *разницу* в свойствах ферментов. Скорее всего будут говорить о *стабильности* в водных смесях, а при сдвигании температуры - о *термостабильности*.

Типы стабильности

Итак, мы смотрим разные типы стабильности:

1. Дегградация *in vivo*.
2. Причины термодинамической стабильности (*in vitro*).
3. Операционная стабильность в разрезе необратимой инактивации.

Итак, начнём с дегградации *in vivo*. Речь идёт о том, насколько белки *устойчивы* в составе *живой* клетки. Здесь не так уж много системной информации. Но важно отметить, в частности, *время жизни* белков: у большинства белков от 2 до 200 часов.

Основные пути дегградации:

- 1) *Под действием кислых протеаз в лизосомах*. В своё время была Нобелевская премия за исследование лизосом. **Лизосомы** - это станции по переработке клеточного мусора. Они имеют различные *литические ферменты* и умеют *перерабатывать* различные белки, углеводы, липидные остатки. Но они не умеют собирать мусор. Этим занимаются **аутофаги** - мембранные образования, которые *собирают* отслуживший клеточный материал. Далее аутофаги сливаются с лизосомами, и получается **аутолизосомы**, в которых начинается процесс *переваривания*.
- 2) *АТФ и кальций-зависимые протеазы в цитозоле*. Здесь надо обратить внимание на то, что далеко не все протеазы закреплены. Некоторые из них *свободно плавают* в цитозоле, имеющим агрессивную среду. Поэтому мы говорим о том, что белки нужно *защищать* во время *транспортировки* к месту работы (для такой защиты нужны Stress 90).

- 3) **Через комплекс с убиквитином => в протеасомы.** Это Нобелевская премия 2014 года. **Убиквитин** - это маленький *полипептид* (76 аминокислотных остатков), который является маркером на *разрушение*. Образование комплексов с убиквитином (*трёхферментная* стадия) говорит о том, что белок *пора разлагать*. Далее он перемещается в протеасомы, где подвергается *протеолитическому расщеплению*. При этом убиквитин *специфичен* к N-концу. Пока ещё до конца не ясно, как он распознаёт нужные белки.

А что же в белках говорит о том, сколько они будут жить? Здесь надо признать, что нет прямой корреляции стабильности in vivo с тем, что называется брутто-параметрами. Под **брутто-параметрами** понимаются:

- молекулярная масса
- доля вторичных структур
- гидрофобность поверхности и т.д.

То есть, ни с какими из этих обще-структурных моментов нет корреляции. А что же важно? Два момента, указывающих на срок жизни белка:

1) **Наличие сигнальных последовательностей.**

- К примеру, у целой группы *короткоживущих* белков обнаружили следующую последовательность: **Pro—Asp—Ser—Thr** (3-15 повторов). Предполагается, что наличие этой последовательности сообщает о приближающемся *конце* службы белка.
- При этом также важен **N-конец**, потому что он отвечает за комплекс образования *убиквитина*. К примеру, наварили много белков-мутантов и поместили в модельный организм. Выяснилось, что если N-концевым был *финин, аланин, лейцин, аспарат, лизин и аргинин*, то белок жил 3 минуты. Если там были *изолейцин, глутамат, тирозин, глицин*, то белок жил 10-30 минут. А если там были обнаружены *метионин, серин, аланин, тирозин, глутамин, валин, глутамин*, то белок жил долго. Я не нахожу здесь никакой зависимости со свойствами белков, но это можно принять просто как факт. Поэтому это лишь *косвенное* подтверждение важности N-конца.

2) **Локализация.**

Обычно в среднем *короче* всего при прочих равных живут белки, которые просто *плавают*. То есть, это *внутриклеточные растворимые* белки. У них больше всего шансов встретиться с *протеазой*.

Комплексообразование удлинит время жизни белка. Есть два основных момента:

- Возможно, при этом *скрываются лабильные сайты*, чувствительные к деградации. Если есть сайт, чувствительный к протеолизу, который закрыт, то протеазы не могут действовать.

- Если белок с чем-то *связан*, то до него должна добраться *протеаза*. Иными словами, мы переходим из гомогенного режима к **гомогенно-гетерогенному**. То есть, когда оба вещества в *растворе*, им легко встретиться. Но когда система *разнородная*, и наш целевой белок *закреплён*, другая *закреплённая* протеаза до него не доберётся. Это может сделать только *растворимая* протеаза. Соответственно, *вероятность* такого события *меньше*, и *скорость* этой реакции будет *медленнее*. Поэтому в таком случае белок живёт *дольше*.



Лекция 16. Стабильность белков.

Мы продолжаем заниматься вопросами **стабильности белков**. Мы обсудили основные закономерности поведения и жизни белков в составе *живой* клетки. Напоследок мы задались вопросом о том, каковы причины *высокой* или *низкой* термодинамической стабильности. Но перед тем, как это обсуждать, мы выяснили, что данные для этого разговора берутся из взаимосвязи *структуры* и *стабильности*.

Одним из вариантов сравнения является сравнение аналогичных белков из *мезофильного* и *термофильного* источников (но не все белки можно найти в таком сочетании). А вот более универсальным способом является **химическая модификация белков** и **сайт-направленный мутагенез**.

Химическая модификация происходит после завершения трансляции матричной рибонуклеиновой кислоты (синтез белка на мРНК-матрице) или до её завершения. В первом случае модификацию белков называют *посттрансляционной*, во втором случае - *котрансляционной*. Химическая модификация осуществляется благодаря реакциям различных *функциональных* групп аминокислотных остатков, а также *пептидных* связей, и обуславливает *конечную* форму белковой молекулы, ее физиологическую активность, стабильность и способность к перемещению внутри клетки.

Сайт-направленный мутагенез является методом молекулярной биологии, который используется, когда необходимо создать *конкретные* и *преднамеренные* изменения в последовательности ДНК, гена и продуктов генов. Используется для исследования *структуры* и биологической *активности* ДНК, РНК и белков, а также для белковой инженерии.

Вслед за этим мы проанализировали основные итоги, отметив, что наиболее существенными причинами термодинамической стабильности являются:

- большое количество солевых мостиков
- большое количество дисульфидных связей
- большое количество гидрофобных контактов
- компактность белковой упаковки
- включение белка в комплекс с другими компонентами клетки (более сложные структуры)

Далее мы перешли к **необратимым** (*инактивационным*) **процессам** и стали говорить об *операционной стабильности*. Первое, что мы обнаружили - то, что экспериментальные данные различной сложности обычно хорошо описываются **схемой Эйринга**, которая говорит, что **необратимым** (*инактивационным*) **процессам** **обычно предшествуют процессы обратимые**.



При этом, общая константа скорости перехода от N к I зависит как от равновесных стадий, так и от неравновесных.

$$K_{n \rightarrow I} = \frac{K}{1 + K^k}$$

Соответственно, чтобы как-то влиять на *стабильность*, нам надо влиять на обе стадии. Предпочтительным является (*легче реализуется*) влияние на *обратимую* стадию. Но если обратиться к *необратимым* стадиям, то чаще говорят не о физическом или химическом воздействии, а о **молекулярных механизмах инактивации**.

Механизмы необратимых инактивационных взаимодействий

Выделяется два основных механизма необратимых инактивационных взаимодействий:

1. Агрегация.

Выполняется при условии наличия *высаливающих солей*.

1.1. Гидрофобные взаимодействия.

1.2. Электростатика.

Работает при условии $\nearrow I$; $pH = pI$.

1.3. Межмолярная S-S связь.

Работает при условии катализа *тиол-дисульфидного обмена*.

2. Изменение первичной структуры.

2.1. Гидролиз пептидных связей.

Работает при условии $\nearrow t$; экстремальная pH.

2.2. Окисление Cys.

Работает при наличии *окислителей*; $\nearrow t$; экстремальная pH.

2.3. Рацемизация.

Работает при условии $\nearrow t$, экстремальная pH.

2.4. Диссоциация металла.

Работает при наличии *хелатирующих агентов*; экстремальная pH.

3. Диссоциация кофермента или кофактора.

В первом случае проблем не наблюдается. Хотя бывают такие системы, в которых закрепляют кофермент, располагая его близко. Например, такое происходит в *биосенсорах*, где используются *окислительно-восстановительные* реакции. В любом случае, речь о том, что у фермента была некая *группа небелковой природы*, которая

участвовала в *катализе*, и с её уходом фермент прекращает свою работу. Условия сильно зависят от того, что это за группа.

Диссоциация зависит от *изменения температуры* (причём, играет роль повышение и понижение). Вчера мы обсуждали влияние температуры на различные процессы. Кроме того, она зависит от *экстремальной pH*, наличия *хелатирующих агентов, денатурантов и детергентов*.

Можно привести пример фермента *пероксидазы* - гликопротеина, который можно *экспрессировать*. Он широко используется в иммуноферментном анализе. Но сейчас важно отметить, что этот белок содержит *гем*, то есть *порфириновое кольцо с железом* (которое выполняет ключевую роль в процессе *катализа*). Исследователи решили поиграть с изменением металлов в кольце, но сделать это оказалось совсем не просто. Вместо того, чтобы извлечь металл из порфиринового кольца, они *извлекли гем* и заменить его порфириновым кольцом, содержащим *другой металл*.

Эта работа тоже оказалась сложной, потому что выяснилось, что гем можно вытащить только при *сильном изменении pH*. То есть, его надо снижать до 1,5-2. Более того, гем надо как-то *забрать*. К примеру, *экстрагировать* в органический растворитель типа *этилметилкетона*. При комнатной температуре нормальный белок не получится. Поэтому было установлено, что этот процесс должен протекать на *холоде*.

В итоге, с помощью этих сложных манипуляций на выходе удавалось получить около 10% искусственного белка, в котором был заменён металл. Попутно были собраны интересные данные по *замене, удалению и дальнейшему встраиванию простетической группы*. Нужно признать, что для удаления группы кофермента и кофактора приходится зачастую использовать настолько *жёсткие условия*, что после этого удаления начинаются *необратимые* процессы перестройки аминокислотных остатков, которые не удаётся преодолеть.

4. Диссоциация олигомерного белка на субъединицы.

Что будет способствовать диссоциации в данном случае? Напомним себе, что первичные структуры обусловлены пептидными связями. Вторичные структуры завязаны на водородных связях. Со сверхвторичными вопрос спорный. А во всех структурах, начиная с *третичной*, главной движущей силой являются *гидрофобные взаимодействия*.

Но не все неполярные боковые заместители удаётся втиснуть внутрь, и какие-то из них остаются на поверхности, и тогда получаются достаточно протяжённые *гидрофобные области*, которые позволяют мономерным белкам связываться в *олигомеры*. Иногда внутри этой неполярной области могут возникать *солевые* или *дисульфидные мостики* (но необязательно). В случае гидрофобных взаимодействий *усилению* данного механизма будет способствовать *снижение полярности*, наличие *органического растворителя* (замедляющего уход неполярных боковых заместителей),

Δt , $pH > pI$ или $pH < pI$ (уход из pH оптимума), а также добавление *холоотропных* или *всаливающих агентов* (мочевины, гуанидинийхлорида).

Получается, что диссоциация белка на субъединицы не так уж сложна, если бы она протекала в *мягких* условиях. Но добавление *экстремальных pH* условий может привести к *инактивационным процессам* в самих субъединицах. В частности, могут открыться сайты, наиболее чувствительные к *инактивации*.

Попутно представим себе, что такое **мицеллы**. Когда имеет место ситуация, что *поверхностно активное* вещество присутствует в некоторой концентрации *выше предельной* (критическая концентрация мицеллообразования), образуются некие сферические структуры. Движущая сила этих образования - всё те же *гидрофобные* взаимодействия. В системе, когда на месте воды находится, к примеру, *n-октан* (при минимуме воды), то реализуется обратная связь: полярные головы будут смотреть внутрь, а хвосты - наружу.

Если же вместо воды использовать водный *раствор фермента*, то фермент встроится внутрь мицеллы. Было установлено, что олигомерный состав белка в такой системе зависит от *размера* мицелл. А размер мицелл зависит от соотношения *количества воды* и *поверхностно активного* вещества. Этот параметр называют **степенью гидратации**.

Если у нас *воды* относительно ПАВ *много*, то получаются *крупные* мицеллы, куда влезает весь олигомер. Но если при этом мы начнём *добавлять* ПАВ и октан при *сохранении* объёма воды, степень гидратации начнёт *падать*, а мицеллы - *уменьшаться*. Если они станут настолько малы, что начнут *давить на* олигомерный белок, то последний распадётся на *субъединицы*, которые будут каждая в своей мицелле. Это было показано на многих ферментах. Таким образом была показана *активность* многих *субъединиц*.

Главное здесь то, что, *меняя* степень гидратации, мы можем *собирать* и *разбирать* олигомеры.

5. Сорбция на стенках сосуда.

Работает при *низких концентрациях* белка. В принципе, многие ферменты обладают *высокой* каталитической активности. В принципе, при *чувствительных* методах, для экспериментов достаточно брать белки в *нано-молярных* концентрациях (10^{-9}). При этом случаются ситуации, когда *фермент* в определённый момент *исчезает*. Конечно, причиной может быть просто *денатурация*. Но если такого не было, то куда он делся? Нужно вспомнить, что используемая *посуда* сделана из определённого *материала*. На обычном *стекле* на поверхности имеются связанные с кремнием ОН-группы. Они довольно активны и могут образовывать *водородные связи* и взаимодействовать с белком. За счёт такой *абсорбции* белок на стенках сосудов будет *связываться с* *силанольными* группами стекла.

Допустим, мы гидрофобизируем стекло или возьмём *полимерный сосуд*. Тогда фермент будет теряться за счёт *гидрофобных* взаимодействий. Поэтому надо быть аккуратными и учитывать данный механизм.

6. “Необратимые” конформационные изменения.

Здесь способствующим условием будет *нагрев*, за которым следует *резкое охлаждение*. При изучении фермента иногда требуется нагревание. Это нагревание до 30-50 градусов. Температура способствует переходу N в D. При *резком охлаждении* такой системы фактически замораживается D. То есть, оно будет защищено высоким активационным барьером. Получится *как бы необратимое* конформационное изменение, но оно кинетически *контролируется*. Если этот фермент *аккуратно прогреть* и *медленно охладить*, то скорее всего большая его часть *вернётся* обратно в N-конформацию.

Подытоживая разговор о механизмах необратимой инактивации, стоит сказать, что учёных интересуют **пути стабилизации**.

Выделение и очистка белков.

Мы подошли к теме **выделения и очистки белков**. Здесь надо сделать небольшой исторический экскурс. Дело в том, что *выделение различных экстрактов* из растительных и животных объектов довольно долго было предметом интереса человека. В первую очередь, эта перспектива волновала *алхимиков* и *лекарей*. До поры до времени эти попытки проходили не более чем в формате *рецептуры*. В какой-то момент стало понятно, что существуют *белки*. Только ближе к концу XIX - началу XX вв. сформировалось понимание того, что *белки* — это *биомолекулы*, подчиняющиеся общим физико-химическим законам: *термодинамике, кинетике* и т.д.

Таким образом, выделение и очистка превратились в научное направление исследование с целенаправленным построением и проверкой гипотез. Соответственно, мы должны ввести некую **таблицу стратегий и этапов**.

Стратегии

Подумать:

1. Поиск источника / биоматериала.

Это не всегда возможно сделать, поскольку бывают ситуации, когда нужно выделить белок из *конкретного* организма. Если же мы *свободны* в выборе организма, то здесь есть несколько моментов:

- *Экономика* (стоимость и т.д.)
- *Содержание* белка в биоматериале

Понятно, что **оптимальный** по цене и содержанию белка материал встречается крайне редко. В большинстве случаев это некоторое соотношение явных достоинств и недостатков.

Допустим, есть растение, в котором *много целевого фермента* (что хорошо). Но это растение растёт *высоко в горах* в другой стране (что плохо). Или *бром-пероксидаза*, которая выделяется из определённых глубинных водорослей.

Иными словами, необходимо сделать **правильный выбор** (оптимальный).

2. Наметить стратегию.

Это можно сделать, если про искомый белок *что-либо известно*. В противном случае, стратегию наметить не получится, и придётся начинать с *набора базовой* информации.

3. Надёжный способ регистрации ферментативной активности.

При выделении *функциональных* белков нужен способ зафиксировать его искомые свойства *количественно*.

Разрушить биоматериал:

Всё сильно зависит от того, как белок *локализован* в клетке. Мы вспоминали, что белки могут быть:

- внутриклеточные
- секретируемые
- интегральные мембранные
- периферические
- поверхностные

Попутно надо вспомнить про клеточные стенки: у бактерий - это *пептидогликан*, у растений - это *целлюлоза*, а у животных - это *плазматическая биомембрана* (проще всего работать).

Соответственно, надо сказать про типы гомогенизации белка:

1. Механический:

1.1. **Слабой силы** (нож, мясорубка). Если мы хотим заниматься выделением из печени, то предварительно её нужно *порезать* на мелкие куски.

1.2. **Средней силы** (всякие лопастные гомогенизаторы, миксеры, *перетирание* с абразивом). В частности, кварцевый песок.

1.3. **Сильные** (прессы Френча). Есть некий объём и поршень с сеткой, который движется по оси, пропуская только определённые частицы. *Френч-прессы* действуют на *суспензии* клеток, разрушая клеточную стенку и *продавливая* всё содержимое дальше.

2. Физический:

2.1. **Осмоз**. Он возникает, когда у нас есть *градиент концентрации* по разным сторонам биомембраны. Что происходит, если внутри концентрация соли *выше*, чем снаружи, и появилась вода? Будет выходить вода под действием *осмотической* силы. В результате клетка может лопнуть. Обратная ситуация, когда соль устремляется наружу, приводит к *аналогичному* эффекту. Примером служит *эритроцит*. Свежий порез под водой (или в рассоле) будет щипать - это лопаются эритроциты под действием осмоса.

2.2. **Изменение температуры**. Это в первую очередь *заморозка*. Дело в том, что *нагревание* для процессов гомогенизации *не годится*, потому что обычно клеточная стенка *более устойчива* к действию высоких температур, чем белки внутри. При этом белки *инактивируются* (разве что в случае *термостабильных* белков этого не происходит). А вот заморозка может помочь особенно для *бактериального* и *растительных* типов белка.

3. Химический.

Они нужны в большей степени для *интегральных* белков, которые очень *тяжело вытащить* из мембраны. Чтобы забрать такой белок, нужно добавить *ПАВ*. А разве белки не меняют конформацию при выходе из мембраны? Чтобы не разрушить конформацию, нужен также *неполярный органический растворитель*. Фактически, нам надо разрушить би-слой, разобрать его и достать необходимый белок.

При этом мы понимаем, что если убрать ПАВ, то тогда белок начинает *агрегировать*. Поэтому необходимо будет *поддерживать* некоторую постоянную *концентрацию* ПАВ.

4. Биологический и ферментативный.

В природе *ферменты* обычно активно используются для *разрушения* различных материй. Если мы разрушаем клеточную стенку, то возможно использование *ферментов*.

Первый пример - *лизоцим* (который разрушает клеточную стенку у *бактерий*, разрушая межуглеводные связи), а второй - это *пептидаза*, которая разрушает олигопептидные мостики). Третий вариант - *целлюлазный комплекс*. Мы уже говорили, что большинство животных не способны разрушать клеточную стенку целлюлозы. Всё же есть такие организмы, которые используют этот комплекс (включающий целый набор гликолитических элементов). Например, целлюлазный комплекс есть у виноградной *улитки*.

Таким образом, мы видим, что арсенал методов гомогенизации довольно широк, и всегда

можно подобрать соответствующую стратегию для того или иного биоматериала.

Приготовление грубого экстракта:

Допустим, мы *разрушили* клеточную стенку. Однако, теперь надо целевой белок забрать и начинать чистить. В разрушенном биоматериале плавают много лишних объектов (органеллы, осколки клеточной стенки, нуклеиновые кислоты и т.д.). Наша задача - перевести в некий *раствор*, не содержащий этих обломков, наш *целевой фермент*. Соответственно, этот раствор и будет *грубым экстрактом*. Практически во всех случаях необходимо *добавление воды*. Исключения составляют только *растения*. Разбавить экстракт (раствор) белка довольно просто, а вот сконцентрировать будет гораздо сложнее.

Соответственно, нам нужно варьировать параметры экстракции:

- рН
- ионная сила (I)
- температура (t)
- органические растворители
- природа соли (катион / анион)

От этого может зависеть (а может и не зависеть) *выход целевого фермента*. Представьте себе, сколько надо попробовать разных значений рН, I, t и солей, чтобы получить чёткую зависимость. Хотя бы пять. Получается порядок 6-й степени. Сколько времени нужно, чтобы перебрать 625 вариантов? Естественно, мы находим *оптимум по отдельным параметрам* => **оптимизация стратегии**.

При этом желательно, чтобы весь целевой фермент был собран за *3-4 экстракции*, иначе разбавление будет слишком сильным. Также важно постоянно измерять активность белка на каждом этапе.

Лекция 17. Выделение и очистка белков (продолжение).

В прошлый раз мы разбирались с **общей стратегией** и **выбором методов** выделения и очистки белков. Если у нас не задана однозначная совокупность задач, то этот процесс всегда сопряжён с неким *поиском*.

Далее нам необходимо *вытащить* фермент. Если *секретируемый*, то это сделать довольно просто. Если же фермент *внутриклеточный* или *мембранный*, то возникают проблемы. Появляется необходимость подготовки *гомогената*. Есть для этого *различные способы разной силы*, которые применимы в той или иной ситуации.

Как только мы произвели гомогенизацию, перед нами возникает задача *“вытащить” целевой фермент*. На этой стадии необходимо приготовить *грубый экстракт*. Если белок *водорастворимый* (что бывает в большинстве случаев), то мы должны добавить воду ко всем источникам биоматериала, кроме растительного. При этом *степень экстракции* - это функция множества параметров. В данном случае, набросать полную сетку едва ли удастся, поэтому приходится *оптимизировать* разные параметры, каждый раз убеждаясь, что мы не вышли за рамки *“идеальной”* системы.

Скажем, мы попробовали три разных рН и начали *варьировать* ионную силу при оптимальном рН. Выбрав ионную силу, мы поставили ещё несколько точек, чтобы убедиться, что мы имеем наиболее *оптимальный* вариант. В результате мы имеем серию из 10-20 экспериментов, которые можно исполнить за обозримое время.

Допустим, мы достигли идеальной ситуации, когда за 3-4 экстракции нам удалось собрать нужное количество целевого белка. Напомним себе, что при этом важно делать замеры активности, чтобы мы точно знали, где и в каком количестве находится целевой фермент.

Стратегии работы при выделении и очистке

Затем мы можем двигаться дальше, продолжая таблицу стратегий:

Стратегии
<u>Подумать</u>
<u>Разрушить биоматериал</u>
<u>Приготовить грубый экстракт</u>

Меры предосторожности:

Наш фермент существовал в составе клетки в *благоприятных* для него условиях вплоть до завершения своего жизненного цикла. Но как только мы *разрушили* биоматериал клетки, все его компоненты оказались в одном пространстве. Нарушилась *компартиментализация*, и пропало *пространственное разделение*.

Поэтому необходимо предпринять меры предосторожности уже на стадии подготовки к гомогенизации:

1. Протеазы.

Протеазы относятся к *ферментному* классу молекул. Нам необходимо понизить её каталитическую активность путём ингибирования:

1.1. *Сериновые протеазы*. Требуется необратимое ингибирование с помощью PMSF.

1.2. *Тиоловые протеазы*. Можно использовать *тяжёлые металлы*, которые будут бить по *цистеину*. Кроме того, можно задействовать *йодацетат* (ICH₂COOH).

1.3. *Металлопротеазы*. Можно добавить *хелатирующие агенты*.

1.4. *Кислые протеазы* (имеют рН-оптимум при *низких* значениях рН). Нужно работать при нейтральных рН, тогда протеазы *перестанут* проявлять свою каталитическую активность.

Как мы видим, спектр средств позволяет *обезопасить* процесс. Главное - понять, какие протеазы нам *важны*, а какие *вредоносны*.

2. Нуклеиновые кислоты.

Клетки в организмах различаются по *относительному содержанию* белка и *нуклеиновых кислот*. Если нуклеиновых кислот *много*, то могут образоваться комплексы с ДНК и РНК за счёт *электростатических* связей. Причём эти комплексы могут получиться неупорядоченными, или же могут выпасть в осадок. Короче говоря, это хоть и *обратимый*, но *обременительный* процесс.

Как же понять, много или мало белка и ДНК в системе?

$$\frac{D_{260}(\text{Н.к.})}{D_{280}(\text{p})} = \begin{cases} \sim 0,5 \\ \sim 1,5 \end{cases} \Rightarrow \begin{array}{l} \rightarrow \text{Н.к.мало} \\ \rightarrow \text{Н.к.много} \end{array}$$

Значит у нас два варианта:

а) Можно добавлять -DNAes и -RNAes, то есть расщеплять ДНК и РНК на более *короткие фрагменты*.

б) Можно добавить в гомогенат *стрептомицинсульфат* в виде порошка, то *комплекс* белков и ДНК *перестанет* образовываться. По-видимому, он отправляет ДНК в осадок.

Велика вероятность реализации *многоточечного* взаимодействия между *нуклеиновыми кислотами* и *положительно заряженными* группами белка. Тогда получится хаотичный и *нерегулируемый* двусоставный комплекс. Есть, например, *гистоны*, которые

используются для *компактизации* нуклеиновых кислот. У них очень много *положительно заряженных* групп, и на них наматываются нуклеиновые кислоты.

Среднестатистический белок содержит тоже *немало* положительно заряженных белковых групп. Конечно, это может снизить выход солевого фермента. Поэтому нужно с этим бороться. Каким образом?

в) Существуют *интерполиэлектролитные комплексы*, прочность которых зависит от *длины* полимеров. Чем короче полимер, тем менее прочный комплекс. Поэтому, если взять длинные молекулы *полианионов* и порезать их на короткие куски *олигоанионов*, то такие комплексы *не смогут* образоваться, и мы не потеряем наш целевой белок.

г) Вывести нуклеиновые кислоты в *осадок*, для чего можно пользоваться *специфическими реагентами* (например, *стриптомицинсульфатом*).

3. Полифенолы.

Это в первую очередь имеет отношение к *растительным* белкам. В растениях много полифенолов, и пока растение пребывает в *интактном* состоянии, они живут в *исходном* виде, *не оказывая* на белки отрицательного взаимодействия. Дело в том, что в организме поддерживается правильный *окислительно-восстановительный баланс*. Для этого даже задействуется специальная система *глутатионов*. Но как только мы *разрушаем* клетку, полифенолы подвергаются воздействию *кислорода* в *повышенных* концентрациях.

Таким образом, происходит *окисление* структурных компонентов, и полифенолы будут превращаться в *хиноны*. Это значит, что пойдёт *неупорядоченная полимеризация*. Например, есть фермент *лакказа* (окислительно-восстановительный фермент, содержащий медь), или *пирокатехин* (содержащий две ОН-группы в бензольном кольце в орто-положении). Исходно система практически *бесцветна*. Далее по ходу реакции начал образовываться *жёлтый* цвет. Если эту реакцию не остановить, в кювете образовывалась *бурая* вязкая субстанция (происходит *полимеризация хинона*).

Так вот, в случае фенолов может идти *полимеризация* с захватом целевого фермента, соответственно, мы можем *потерять* целевой белок в неупорядоченном агрегате. Каким образом с этим бороться?

д) Можно добавить *восстановители* (если только это не повредит целевому ферменту), либо *поливинилпирролидон* (довольно инертный полимер). За счёт в первую очередь *водородных* связей с полифенолами он образует комплексы, которые предотвращают окисление последних. Соответственно, если перед гомогенизацией растительного материала посыпать вещество *поливинилпирролидоном*, скорее всего потерь от окисления полифенолов не будет.

Добавляя все эти разнообразные *агенты* (в случае протеаз, нуклеинов или полифенолов), необходимо вначале убедиться, что они *не вредят* нашему *целевому ферменту*. Соответственно, требуются *дополнительные проверки*.

Лабораторные приёмы:

Какие задачи могут возникать в лаборатории?

1. Разделение осадка и супернатанта.

Какие варианты возможны для этого разделения?

1.1. **Декантация.** Правда вряд ли получится получить такой *плотный осадок*, который можно будет лишиться жидкости, не испортив поверхностную структуру. Поэтому для декантирования нужно дать системе *настояться*, а в этом случае начнётся *изменение* в гидрофобных взаимодействиях.

1.2. **Фильтрация.** В случае белков фильтрация годится далеко не всегда. Дело в том, что у белков существует масса разнообразных *поверхностных групп*, а бумажный фильтр содержит *целлюлозу* (с её *ОН-группами*). Соответственно, много белка может *абсорбироваться* в фильтре. В случае стеклянного фильтра та же ситуация только с *силанольными* группами. Фильтрация используется *редко*, поскольку требует введения дополнительного *контактирующего материала*.

1.3. **Центрифугирование.** Самый *быстрый* и *надёжный* (в данном случае) способ. Довольно эффективно получается сделать *плотный осадок*, с которого можно удалить надосадочную жидкость. Здесь стоит быть аккуратными и *не торопиться избавляться* от *осадочной жидкости* раньше времени. Есть вероятность ошибки в процессе или расчётах, и фермент мог остаться в её составе. Поэтому пока мы полностью не стандартизировали процедуру, необходимо осуществить дополнительные *проверки* на наличие целевого белка в осадочной жидкости и в перерастворённом осадке.

Есть несколько важных моментов при центрифугировании. Это некоторые *ограничения*:

- Одно из них связано с *особенностями осадка* в растворе. Центрифугирование разумно для разделения, когда осадок образуется *на дне* пробирки. А условием того, что осадок будет образовываться именно на дне, является другое условие: что **плотность осадка больше плотности жидкости**:

$$\rho_{\text{осадка}} > \rho_{\text{жидкости}}$$

Форма может сказываться скорее *на скорости образования* осадка. Но если у нас *твёрдые частички менее плотные*, чем жидкость, то будет наблюдаться *флотирование* осадка.

- Другое ограничение связано с *уравновешиванием стаканов*. При выделении белка могут быть большие количества вещества, соответственно нужны *большие препаративные центрифуги* (литровые и даже больше). Поэтому крайне важно *уравновешивать* стаканы в них, чтобы не поломать ротор вращения. Часто у ротора шесть гнезд (Рисунок 17.1.). Если у нас *два стакана*, то мы размещаем их друг напротив друга (*центрально-симметрично*). Если у нас *три стакана*, то размещаем их *через один*. А если у нас *один стакан*, то следует взять *ещё один*

(наполненный равным по массе объёмом воды). Кроме того, следует использовать крышки, особенно в случае летучих органических растворителей.

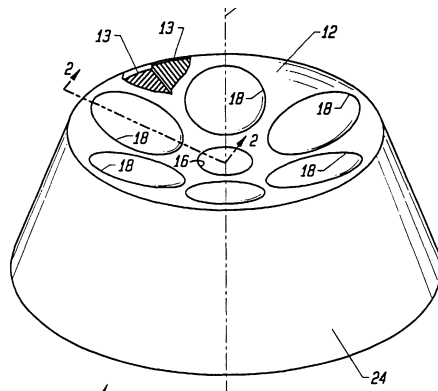


Рис. 17.1. Строение ротора

- **Обессоливание или смена буфера.** Для этого есть несколько вариантов:

Во-первых, часто бывает, что у нас белок находится в растворе с *высокой концентрацией соли* => тогда требуется *обессоливание*.

Во-вторых, бывает, что мы провели одну стадию в *карбонатном буфере*, а теперь нам надо перейти в *ацетатный буфер* (с другим pH). У нас есть два варианта:

- 1) **Гель-фильтрация (ГПХ).** Нам нужно разделить *большой белок* и *маленькую по объёму соль*.

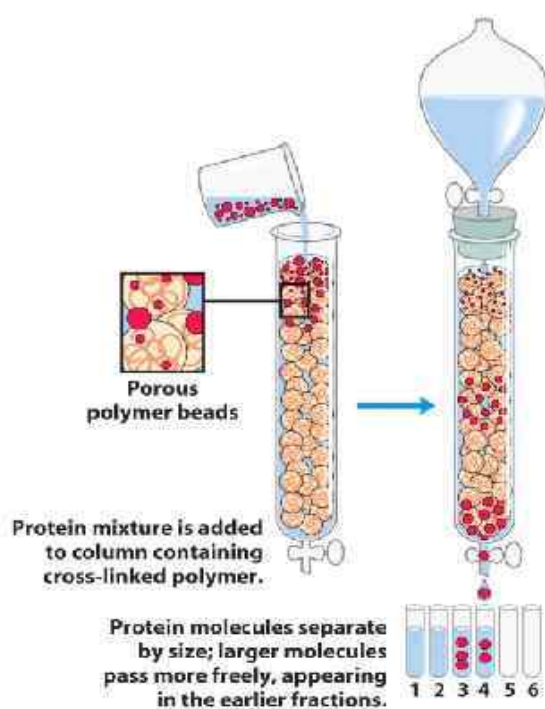


Рис. 17.2. Схема гель-фильтрации

В колонке находится высокоразвитая *внутренняя* поверхность (*пористая*). Представьте себе, что молекулы делятся по размеру. Попутно отметим, что **хроматография** - это разделение веществ, основанное на разном средстве к подвижной и неподвижной фазе. В данном случае *подвижная фаза* - это *растворитель*, а *неподвижная* - *гранулы*. Средства как такового нет, но будет *диффузия*. То есть, молекулы диффундируют внутрь, и пока они находятся внутри гранулы, они в *неподвижной* фазе. Как только они выходят, они с током растворителя продвигаются *вниз*. Затем процесс повторяется. Всё это справедливо для веществ, которым доступна хотя бы часть *внутреннего объёма*.

Есть, например, маленькие ионы, которые могут проходить во *все ячейки*. Есть и вещества, которые проходят только в *крупные* ячейки. Но если объект очень *большой* с точки зрения *гидродинамического диаметра*, то он не пройдёт *ни в какие ячейки*. Это как раз наш случай. *Соль* будет попадать всё время внутрь и останется неподвижной. А *белок* (правильно подобранный) вообще не будет попадать внутрь. Белок выйдет наружу *раньше*, с фронтом растворителя. Мы начинаем подавать туда растворитель *элюент* в виде воды с низкой концентрацией солей.

Ещё очень важно *подготовить колонку*. Её нужно набить и прогнать 10 объёмов растворителей для *плотной утрамбовки*. После 10 объёмов можно считать, что колонка *уравновешена*.

А если мы хотим поменять буферный элемент, то нам надо *уравновесить* колонку и провести *элюирование новым буфером*, соответственно.

- 2) **Диализ**. В ходе диализа (для обессоливания или смены буферной компоненты) используется *полупроницаемая* мембрана. Есть так называемые “*диализные мешки*”, которые могут превращаться в *трубки* (будучи обработанными специальным образом). Мы отмеряем и отрезаем нужную *длину*, завязывая в мешке концы и закрепляя его над ёмкостью.

У нас есть внешний объём и внутренний раствор, где находится *целевой фермент*. Если у нас во *внешнем* объёме *вода*, а внутри - *раствор белка в соли*, то *вода и соль* могут спокойно проходить сквозь полупроницаемую мембрану, а фермент *не может*. В результате, фермент останется во внутреннем мешке, а внешняя среда придёт в *равновесие*.

Соответственно, мы сможем *снизить концентрацию соли* в диализном мешке. Поскольку концентрация соли внутри больше, чем снаружи, первым действием в ситуации *осмоса* является проникновение воды в ту часть, где концентрация соли выше. Значит, вода хлынет в *мешок*, и если он сильно заполнен, то он *может порваться*, а это означает фактически потерю фермента, потому что соотношение внутреннего к внешнему - 1/10 (потому что чем больше будет внешний объём, тем быстрее мы сможем снизить концентрацию соли). Соответственно, лучше *выводить концы* мешка *наружу* или использовать фирменные *зажимы*.

Процесс диализа *не слишком быстрый*. Поэтому, чтобы *ускорить* приход к равновесию, всю конструкцию обычно помещают на *магнитную мешалку* и включают перемешивание. Процесс длится около 1-2 часов на холоде. Обычно, цели удаётся достичь за 3-4 смены внешнего объёма (в зависимости от задач).

Можно ли использовать диализ для *смены буферной компоненты*? Дело в том, что гель-фильтрация является довольно *быстрым* процессом, и требования гель-фильтрационной колонки для смены буфера *не слишком адекватны*. Диализ хорошо подходит для ситуаций, когда раствор можно оставить на ночь.

3) **Концентрирование.** Разбавить раствор довольно просто, а вот концентрирование - более кропотливая задача. Но подходы всё-таки есть:

- **Ультрафильтрация.** Сквозь водопроницаемую мембрану будут проходить капли воды, а фермент будет оставаться *сверху*. В результате, будет *уменьшаться* объём и *расти* концентрация. Желательно уменьшать объём не более чем в 10 раз. Подойдёт ли этот метод для обессоливания? В отдельных случаях можно снизить в 10 раз концентрацию и провести обессоливания.

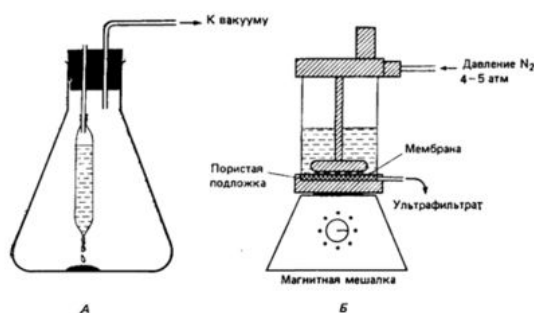


Рис. 17.3. Схема ультрафильтрации

- **Диализ.** Как можно сконцентрировать раствор? Провести диализ, когда внешний объём - это *гигроскопичное* вещество (твёрдое и неагрессивное). Можно взять полимеры (*полиэтиленоксид* с высокой молекулярной концентрацией), либо что-то ещё. Сложность в том, что внутри мешка при диализе образуется *слизеподобная* субстанция, и достать оттуда полученный концентрат очень *сложно*.

4) **Получение сухих препаратов ферментов.**

Здесь главным методом, который доступен нам, является **лиофилизация** (лиофильная сушка). График для воды будет выглядеть следующим образом:

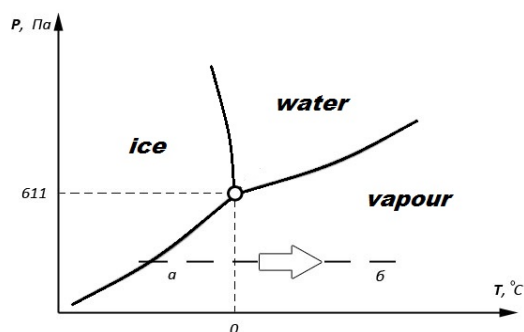


Рис. 17.4. График изменения состояний воды при лиофильной сушке

Что мы наблюдаем с водой на практике? Мы имеем все три агрегатных состояния, которые *переходят друг в друга*. Но если мы *откачаем давление*, то мы сможем перемещаться между фазами, *минуя фазу жидкости*. Это описывается процессами *возгонки* и *сублимации*. На этом и построен принцип работы лиофильной сушки.

У нас есть *насос*, который откачивает давление. С ним соединена *камера*, в центральной части которой имеется *холодильник* (самая холодная часть системы). Также есть либо *полочки* (и система замкнута), либо *отводы под колбы*. Мы заливаем в колбу *раствор фермента*. Пример такой: берём жидкий азот и наливаем в ёмкость из пенопласта, и в нём начинаем вращать колбу. В результате наша жидкость размазывается по колбе и *замерзает* тонким слоем. Снаружи образуется *иней*, который указывает на качественную заморозку.

Далее мы отправляем эту конструкцию на лиофильную сушку и включаем систему: откачивается давление, и включается холодильник. При пониженном давлении, молекулы воды переходят из *твёрдой* фазы в *газообразную*. Поскольку самое холодное место в системе - *холодильник*, эти молекулы образуют *шубу* уже на нём. В результате в колбах остаётся *сухой порошок фермента*.

Что ещё будет содержаться в этом порошке? Там будет *примесь соли* (исходного *буфера*). Таким образом, можно сказать, что лиофилизация *не позволяет избавиться от соли* в ферментном веществе. Поэтому данный метод часто используется в качестве промежуточного *запасания целевого фермента* в сухой форме.

Лабораторный журнал:

Это очень важный этап лабораторной работы. Особенно это важно, когда речь идёт о записях данных при выделении и очистке. Необходимо вести таблицу из большого количества столбцов:

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
---	----	-----	----	---	----	-----	------	----

№ стади и	Стадия	$V_{\text{сист}}$	Удельная конц. белка мг./мл.	Общая конц. белка III x IV	Удельная активность ед./мг.	Общая активность V x VI.	Степень очистки VI_i/VI_1	Выход по белку VII_i/VII_1 $\cdot 100\%$
1	Грубый экстракт						1	100
2							100	80
...						

Мы на каждом этапе заполняем таблицу, *замеряя все параметры*. В конечном счёте, мы рассчитываем *степень очистки* целевого фермента и *белковый выход*. Для каждой стадии мы смотрим, нужна ли эта стадия или нет.

Главное, на чём я бы хотел закончить: эта работа подразумевает *работу с балансом*. Параметры *взаимно влияют друг на друга*. Поэтому надо всегда понимать, что и для чего мы чистим. В крайних случаях мы хотим сделать *кристалл*, или же исследовать *чистый белок*. В первом случае, мы можем потерять большую часть белка, главное, чтобы *степень очистки была высокой*. А если мы создаём *препарат*, то нас вполне устроит средняя степень очистки, но нужно *большое количество выходного белка*.

Иными словами, **в зависимости от изначальной задачи, нужно стремиться определять верный баланс параметров, переходя от одной стадии к другой**. Тем самым, мы возвращаемся к исходному пункту - подумать.

Лекция 18. Выделение и очистка белков. Часть третья.

Мы продолжаем рассматривать вопросы выделения и очистки белков. Мы разобрали общие стратегии и подходы, выяснили, какие есть источники и специфические свойства у различных биоматериалов, мы выяснили действующие методы гомогенизации для всех белков, кроме секретируемых. Кроме того, мы посмотрели, что такое грубый экстракт и выяснили, от чего зависит эффективность экстракции. Также мы рассмотрели лабораторные приёмы, включая запись результатов, целей и задач.

Надо помнить, что цели и задачи определяют тот продукт, который мы хотим получить. Если нам нужен чистый препарат, но не важно количество (в случае научных исследований), там мы должны основное внимание уделять *степени очистки*. При этом, мы можем чуть меньше внимания уделять выходу. Если же мы хотим получить промышленное средство, то в данном случае важно произвести *достаточное количество* на выходе.

Сейчас мы переходим от грубого экстракта к более чистым препаратам. По идее, это можно было бы делать с помощью *хроматографии* или *электроаналитических* методов, но зачастую с грубым экстрактом это не целесообразно, потому что на данной стадии в экстракте присутствуют смеси различных белков. Перед тем, как применять эти методы, исследователи очень часто сначала обогащают экстракт *целевым ферментом*, то есть избавляются от балластных белков. Доля содержания целевого фермента растёт.

Для того, чтобы произвести *фракционирование*, необходимо *осаждение*. А осадить можно разными способами. При этом у нас есть две возможности:

- 1) Мы можем оставить наш целевой фермент в растворе и *осадить белки*, которые нам не нужны;
- 2) Мы можем *осадить целевой белок* в нативном состоянии, избавившись от балластных белков в виде надосадочной жидкости, перерастворив затем осадок.

Оба варианта возможны, и в конкретном случае надо определяться с нужной *стратегией*.

Фракционирование осаждением

Ну а теперь обратимся к тем *воздействиям*, которые могут привести к образованию *осадка* (двухфазной системы, которую впоследствии можно будет разделять):

1) Изoeлектрическое осаждение.

По мере работы с различными белками в середине 70-х годов был установлен странный факт: если к раствору белков глобулинов добавить *деионизированной воды* (с

низким содержанием солей), то система разбавится, но при этом выпадет *осадок*. Этот осадок будет состоять из белков-глобулинов. Это свойственно только глобулинам. Например, белки-альбумины, транспортирующие жирные кислоты в организме, таким свойством не обладают, как и многие другие. С чем же связана эта аномалия? Чтобы разобраться, построим график зависимости растворимости белка от рН:

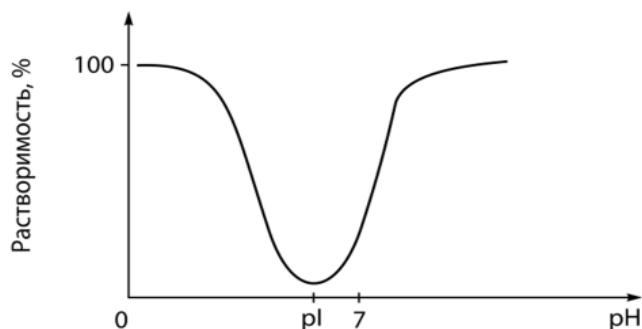


Рис. 18.1. График зависимости растворимости белка от концентрации среды

В точке, близкой к изоэлектрической, у белка присутствует много сильно заряженных групп (положительно и отрицательно), и высока вероятность встречи двух разных глобулы разноимёнными областями, в результате чего произойдёт *агрегация*. Если мы движемся влево от этой точки, все глобулы становятся положительно заряженными, соответственно, становятся одноимённо заряженными и начинают отталкиваться, и растёт растворимость (тяжелеет осадок). При движении вправо, когда глобулы заряжены одноимённо отрицательно, в результате получается кривая с минимумом в области изоэлектрической точки.

При разбавлении системы вырастет прочность электростатического контакта, а осадок будет образовываться при более *низких концентрациях* (кривая пойдёт ниже). А если мы добавим немного низкомолекулярного электролита, то низкомолекулярные катионы и анионы будут конкурировать с зарядами белковых глобул за заряды других глобул, соответственно, белковые агрегаты через электростатическое взаимодействие будут образовываться при более *высоких концентрациях* (и кривая пойдёт выше).

Таким образом, можно делить белки по их склонности к образованию агрегатов через *электростатические взаимодействия* (подчиняющиеся закону Кулона). Следует подчеркнуть, что этот вариант осаждения нельзя рассматривать в качестве универсального, поскольку самые разнообразные белки будут не очень сильно различаться по указанной склонности. Этим способом можно пользоваться, зная аномалию белка (в частности, глобулина).

2) **Высаливание.**

При добавлении некоторых *солей*, в данном случае уже за счёт *гидрофобных взаимодействий*, тоже могут образовываться белковые *агрегаты*. Соли можно разделить на *высаливающие* и *всаливающие*. Например, есть так называемый *ряд Гофмейстера*, который распределяет соли по их способности либо подавлять, либо катализировать

гидрофобные взаимодействия. Соответственно, добавление *высаливающих* солей приводит к *увеличению* гидрофобных взаимодействий и образованию *осадка*.

В общем-то, нет очень сильной зависимости высаливающей силы от катиона, а вот в случае *аниона* она, конечно же, будет: чем *более многозарядным* является анион, тем более *сильной высаливающей способностью* он обладает. К примеру, *хлорид* будет обладать меньшей высаливающей силой, чем *фосфат*, а тот, в свою очередь, меньшей, чем *сульфат*. Казалось бы, что сильнее должен быть фосфат (3-), но давайте вспомним, что в такой форме фосфатная группа существует при $\text{pH} > 12$, а при $\text{pH} = 7$, это смесь имеет заряд уже ближе к -1,5, в то время как сульфат имеет -2.

Сначала давайте разберёмся, за счёт чего вообще происходит высаливание, а затем посмотрим, какие требования существуют к *идеальной соли* (и есть ли такая соль вообще). У нас есть одна глобула белка, и на ней есть гидрофобный участок, окружённый льдоподобной структурой. А есть другая глобула белка с таким же участком. Мы помним, что есть у нас некий фрагмент или *неполярная* молекула оказываются в водной среде и не могут добраться до поверхности раздела, то вокруг них *замораживается* часть воды, причём удаётся *сохранить* практически полностью количество водородных связей на систему (то есть нет энтальпийного проигрыша). Тем не менее, мы имеем энтропийный проигрыш, потому что мы переходим к более структурированной системе с точки зрения молекул воды.

При этом *движущей силой слипания* молекул гидрофобными областями является размораживание молекул воды и их выход в объём растворителя. Принято считать, что

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

Не будем забывать, что освободившиеся молекулы не просто уходят, а *встраиваются* в трёхмерную сетку водородных связей воды. Соответственно, белок присутствует в растворённом виде в растворе. То есть, выигрыша в энтропии за счёт размораживания части молекул клатратной воды недостаточно для того, чтобы две молекулы образовали агрегат.

Тогда мы начинаем добавлять соль. Она гидратируется (гидратация катиона и аниона), и всё меньше воды остаётся у нас в системе. Тогда можно забрать ещё *немного воды из замороженных клатратных областей двух молекул*, тем самым не только повысить энтропию, но ещё и направить её на *гидратацию катиона и аниона*. Суммарный выигрыш приводит к тому, что в целом процесс становится *выгодным*, а дельта G становится меньше 0, и начинается агрегация. Это и есть **процесс высаливания**.

Каковы требования к соли?

- **Высокая высаливающая сила.** Нам не подходят все слабовысаливающие, а также всаливающие соли.
- Вслед за образованием осадка нам надо *разделить* его и надосадочную жидкость. Чаще всего для этого используется *центрифугирование*. Чтобы его

можно было применять, надо, чтобы **плотность осадка была больше плотности раствора**.

- **Высокая растворимость.** Если растворимость соли низкая, мы не сможем создать сильно различающиеся условия, то есть у нас будет слишком короткая шкала абсцисс, а нам надо расставить белки по их способности к выпадению в осадок.
- **Доступность в чистом виде.** Здесь я объединил два момента. Во-первых, играет роль *стоимость* соли. Во-вторых, соль нужна в *чистом* виде, чтобы не надо было избавляться от дополнительных примесей, что также ведёт к удорожанию исследований.
- **Белок в осадке должен быть стабилен.** Если наш целевой белок (фермент) переводится в осадок, мы должны удостовериться, что мы не потеряем тем самым его активность. Белок должен сохраняться в *осадке неограниченно* долго без существенных потерь *каталитической активности*.

Очень часто используется такая соль, как сульфат аммония – $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. У него одна из самых мощных с точки зрения *высаливающей силы* сульфо-групп. Он имеет высокую растворимость (75 г. / 100 г. раствора). При этом эта соль достаточно *дешёвая*, и что интересно – белок в сульфате аммония проявляет достаточно высокую *стабильность*.

Если вы ведёте очистку, которая длится несколько дней, то для сохранения белка можно высадить белок сульфатом аммония на ночь, а утром избавиться от соли путём гель-фильтрации и продолжить работу.

Давайте посмотрим, как выглядит типовая зависимость белка в соответствующей стратегии высаливания. Четырёхмаллярный раствор сульфата аммония принимают за 100% и рассчитывают процент насыщения белка сульфатом аммония в отношении к растворимости белка. В диапазоне 20% выпадает какое-то количество белка в осадок. В диапазоне от 40 до 60% выпадает самое большее количество белка, далее к 80% осадок снижается. Соответственно, в области *низких степеней насыщения* выпадают самые *гидрофобные* белки. Высаливающая соль даёт последний толчок к смене знака дельта G. А самые *гидрофильные* белки *не выпадут даже при высокой* насыщенности. Следовательно, здесь мы сравниваем белки по удельной гидрофобности поверхности.

Как нам правильно проводить эксперимент? В соответствии со стратегией высаливания. Сначала мы выясняем, в каких значениях наш белок выпадает в *осадок*. При этом мы должны иметь возможность измерить удельную *активность*. Какой вывод мы сможем сделать? Мы сможем понять, что основная часть нашего белка сосредоточена в зонах от 40 до 80%, ближе к середине. Наверное, можно было бы попробовать довести белок до 55% насыщения в растворе. Мы *фракционируем*, забираем в работу *раствор* (надосадочную жидкость, где содержится наш белок), а наиболее *гидрофобные* белки, успевшие выпасть в осадок, мы убираем.

Это был только первый этап. А далее мы доводим раствор до 70% насыщения. При этом наш белок остаётся в *осадке*. Мы удаляем белковый балласт в надосадочной жидкости (наиболее *гидрофильные* белки), затем перерастворяем осадок и продолжаем работу.

При этом важно учесть несколько замечаний:

- **Проверить активность везде.** Мы во время исследования ещё *не знаем точных значений*, когда нам следует вести очистку. Поэтому наша задача – отбрасывать осадок, перерастворять его и *проверять*, не упустили ли мы часть целевого белка.
- **Стратегия.** Если нам важна *степень очистки*, то следует брать самый *узкий интервал* концентрации сульфата аммония. Если же нам важен *выход*, тогда берётся более *широкий интервал*. Почти на каждой стадии придётся делать этот выбор, который определяется конкретными целями исследования.

Ещё пара важных моментов, которые стоят упоминания. Осадок принято какое-то время (обычно порядка одного часа) держать, *инкубировать* при невысокой температуре. Также стоит учесть, что в областях *невысокой степени насыщения* сульфатом аммония, можно пользоваться *концентрированным* раствором, добавление которого будет приводить к существенному сдвигу степени насыщения. А в областях от 80 до 85% лучше использовать *сухой сульфат аммония*, который необходимо хорошо перетереть и равномерно размешать.

Стоит сказать, что высаливание сульфатом аммония – это очень важный распространённый метод, который позволяет делить белки по удельной гидрофобности поверхности. И что важнее всего, часто целевой белок можно перевести в осадок, отделить от него все балластные белки и получить достаточно высоко стабильную концентрацию.

3) Осаждение нагреванием.

Надо понимать, что осаждение нагреванием – процесс достаточно сложный. Если мы возьмём смесь белков и будем отмерять удельную активность при той или иной температуре.

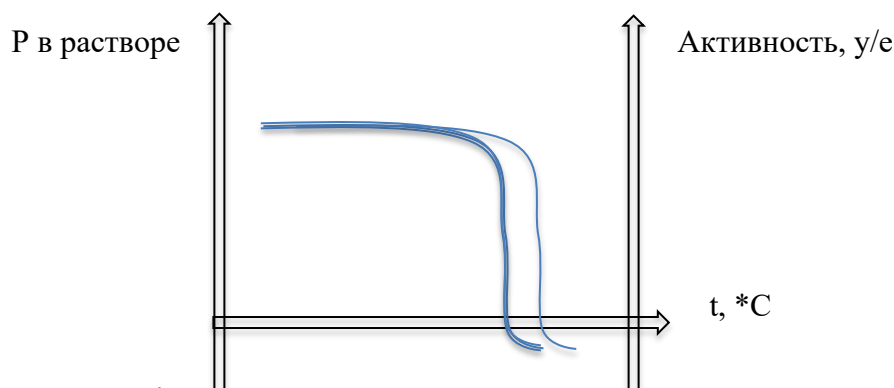


Рисунок 18.2. График зависимости растворимости белка от нагревания

Что начинает происходить в растворе по мере нагревания? Обычно ничего не происходит до момента выпадения. Каждый белок *выпадает при конкретном значении t* . А что при этом происходит с *активностью*? Она *незначительно* растёт или падает. Вообще говоря, в большинстве случаев справедливо правило, согласно которому скорость реакции растёт с увеличением температуры её протекания.

Но далее, при выпадении, в большинстве случаев одновременно с этим падает каталитическая активность. То есть, белки обычно выпадают уже *не в нативной* конформации, а в *денатурированной* (причём, возможно, уже в *инактивированной*). Обычно эта температура термоденатурации (параметр, при котором половина белка окажется в осадке, а половина – в растворе) для разных белков не сильно различается. Таким образом, трудно будет их фракционировать.

Поэтому данный метод вряд ли можно считать универсальным. Он хорошо подойдёт, если мы знаем, что наш белок, к примеру, аномально термостабилен. Тогда мы спокойно догреваем раствор до нужных значений, удаляя балластные белки в осадок. Этот метод применяется в *генной инженерии*, когда, например, начинают в бактерии, которые живут при нормальных температурах, встраивать *термостабильные гены*.

4) Осаждение через изменение рН.

Белки обычно чувствительны. Если говорить о ферментах, то у них есть *изоэлектрическая точка* – та точка, в которой суммарный заряд равен нулю. При рН ниже pI белки заряжены суммарно положительно, при рН выше pI – суммарно отрицательно. Есть оптимум каталитической активности, который часто имеет *колоколообразную* зависимость. Есть некоторая точка *экстремума*, в которой фермент работает наиболее активно. Обычно при уходе на 2-3 единицы от рН-оптимума в ту или иную сторону *активность резко снижается* почти до нулевых значений.

Например, если протеолитический фермент *химотрипсин* (в концентрации 10 в -6 степени моль на литр) оставить на час при рН = 7 или 8 на столе, придя мы обнаружим 10% активности. 90% белка будет утрачено в процессе *автолиза*. Иными словами, белки будут катализировать гидролиз пептидных связей у аналогичных себе молекул. А если мы изменим рН до 3 (то есть уйдём от рН-оптимума к закислению), то сможем держать белок даже при комнатной температуре достаточно *длительное* время.

Осадки образуются только при экстремальных значениях рН (порядка 1, либо 13). За счёт чего это происходит? Начнём с низких значений. Представим себе белок при рН = 7, у которого есть *положительно заряженная* группа, но также есть *ионогенная группа*, которая имеет целых два плюса при закислении. Естественно, возникает электростатическое отталкивание, в результате чего молекула белка претерпевает некое конформационное изменение.

Обычно при *кислых* значениях рН никакого образования осадка не происходит, потому что глобулы *заряжены одноимённо* и электростатически *отталкиваются*. Но если мы после этого вернёмся в рН = 7, то у нас с высокой вероятностью выпадет *осадок*.

Соответственно, то же самое можно расписать и для отрицательных зарядов. В целом же стоит сказать, что и этот метод нельзя считать универсальным. Им имеет смысл пользоваться только если мы знаем, что наш белок обладает аномальной устойчивостью при высоких или низких температурах.

5) *Осаждение при помощи органических растворителей.*

Во-первых, надо сразу оговориться, что мы рассматриваем только те *растворители, которые смешиваются с водой*. В противном случае, возникнет двухфазная система, и скорее всего подавляющее большинство ферментов, поскольку они гидрофильны, будут в водном растворе и фактически не будут подвержены влиянию органических растворителей.

Если растворители всё же смешиваются с водой, то ситуация меняется кардинально: начинают образовываться *растворы, гомогенные системы другого состава*, и это безусловно имеет *влияние* на белок. Чтобы понять, как влияет органический растворитель на белок, надо понять, как он влияет на *невалентные взаимодействия*. Мы помним, что *сворачивание* белков – это процесс, который происходит за счёт таких невалентных взаимодействий.

Каковы же основные влияния органического растворителя?

- Во-первых, при увеличении концентрации органического растворителя в подавляющем большинстве случаев у нас будет *падать диэлектрическая постоянная среды*. Это ведёт к *усилению электростатических взаимодействий*. Причём, это справедливо как для притяжения, так и для отталкивания, потому что *закон Кулона* описывает и тот, и другой случай.
- Во-вторых, повышение концентрации органического растворителя ведёт к *нарушению системы водородных связей в воде*. В воде развитая трёхмерная сетка водородных связей, где на одну молекулу приходится в среднем 3,6 соседа. Это *динамически равновесные системы*, ведь водородные связи мало живут, образуясь и разрываясь вновь. Но их всегда *много*, что *энтальпийно выгодно*. Когда мы добавляем органический растворитель (не в случае глицерина), они не могут поддерживать такое количество водородных связей в молекуле. Например, спирты могут участвовать в двух водородных связях (а вода – в четырёх). Соответственно, не так выгодно с точки зрения энтропии становится прятать боковые заместители (гидрофобные) внутрь белка. Их прятали, потому что они плохо влияли на трёхмерную сетку, а теперь, при нарушении самой сетки, это становится излишним.

Добавление органических растворителей всегда ведёт к усилению электростатических взаимодействий и ослаблению гидрофобных. Всегда надо учитывать этот *баланс*, понимая, что в том или ином случае влияние может быть более или менее сильным. Какие-то ферменты могут быть более чувствительны к

электростатике, а другие – к гидрофобным взаимодействиям. Какие варианты здесь возможны?

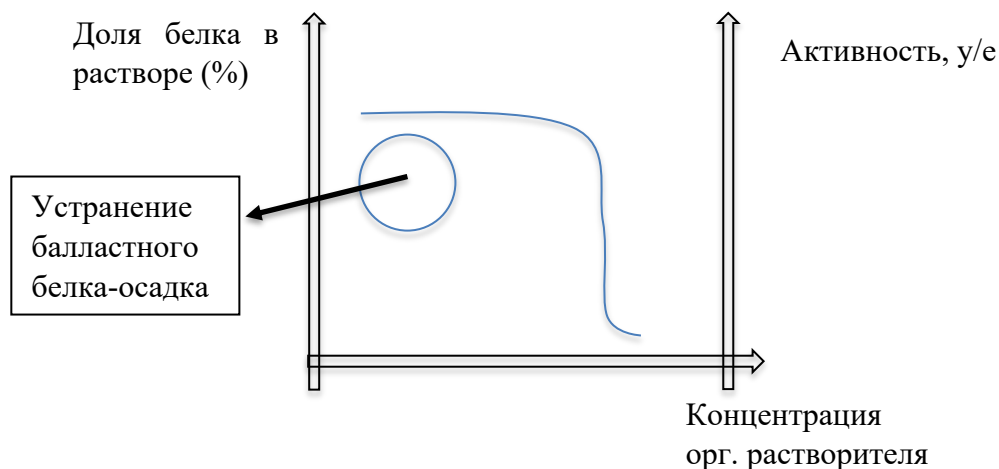


Рисунок 18.3. График зависимости доли белка от концентрации органического растворителя

Мы начинаем добавлять органический растворитель и до поры ничего не происходит как с долей белка, так и с активностью. Конечно, всё зависит от конкретных условий и механизмов ферментативной реакции, и активность может незначительно *расти* или *падать*. К примеру, в случае *протеолитических ферментов*, если добавляемый органический растворитель является *более сильным нуклеофилом*, чем вода (это бывает очень часто), то скорость реакции может и возрасть (правда речь уже о трёхстадийной схеме).

Далее возможны два варианта развития событий:

- **Белок выпадает в осадок в узком диапазоне концентрации, при этом активность не падает.** В этой ситуации мы переводим высаживаем легко выпадающие белки и отбрасываем их. Далее мы переводим наш целевой белок в осадок, перерастворяем его и продолжаем работу. При этом всё, что не выпало и осталось в растворе, тоже отбрасывается. Это происходит в ситуации, когда наш белок обладает существенным количеством зарядом на поверхности, и ему чуть-чуть не хватает снижения диэлектрической постоянной, чтобы выпасть в осадок. При этом это происходит при достаточно невысоких концентрациях. То есть, у нас превалирует влияние растворителя на электростатику, а гидрофобные взаимодействия не нарушены (белок не разворачивается).
- Сначала **целевой белок разворачивается** (то есть растворитель влияет главным образом на гидрофобные взаимодействия), в результате чего на поверхность выходят *дополнительно заряженные группы*, а после он

выпадает в осадок. В этой ситуации мы не можем отправить белок в осадок, но должны сохранить белок в растворе, а всё, что выпадет в осадок, отбросить.

Ясно, что в первом случае использование органических растворителей гораздо эффективнее, потому что в таком случае мы можем отбросить и более чувствительные, и менее чувствительные к электростатике белки и вырезать фракцию.

Напоследок следует сказать, что **осаждение температурой, рН и органическими растворителями взаимосвязаны.** Идёт влияние на *электростатику* с разных сторон. Например, если мы будем осаждать органическим растворителем в изоэлектрической точке, то оно пройдёт достаточно быстро. Но если мы начнём осаждение далеко от неё, то нам придётся добавить большее количество растворителя, и мы рискуем попасть в ситуацию, когда при этом денатурируется белок. То же самое можно сказать и про осаждение нагреванием, когда термоденатурация не происходит до определённой поры, а при добавлении растворителя сумма факторов всё равно приводит к денатурации.

Таким образом, когда мы говорим об осаждении с использованием любого из вышеобозначенных подходов, нам обязательно надо проверить зависимость от двух других способов и подобрать оптимальные условия, которые учитывают и температуру, и рН, и концентрацию органического растворителя.

Лекция 19. Хроматографический и электрофоретический методы очистки белков.

Сегодняшняя лекция будет посвящена **хроматографическим** методам очистки белков и **электрофоретическим** методам очистки белков. Мы прошли все вводные части, дошли до состояния грубого экстракта и выяснили, каким образом обогатить эту сущность целевым ферментом и *очистить* белок. Для этого используются различные методы, в частности, различные способы *фракционирования* и *осаждения*. При этом мы помним, что приоритет обычно отдаётся либо чистоте целевого белка, либо его выходу, и от этого зависит определение общей стратегии.

Классификация хроматографических процессов

Хроматография используется при разделении смесей на индивидуальные компоненты. В хроматографии всегда есть **подвижная фаза** и **неподвижная фаза**. Это разделение основано на *разном сродстве компонентов* смеси. Те компоненты, которые больше склонны к пребыванию в подвижном состоянии, выходят (заканчивают хроматографический процесс *раньше*), а те, которые склонны к пребыванию в неподвижном состоянии, заканчивают дистанцию *позже*.

Вариантов хроматографических систем крайне *много*. Необходимо ввести некую классификацию. Классифицировать хроматографию можно по самым разным основаниям. Давайте попробуем обозначить эти признаки.

1) По подвижной фазе:

1. **Жидкостная**
2. **Газовая**

2) По инженерному исполнению (формату):

1. **Бумажная.**

В качестве носителя выступает бумага, и вещество расходится по бумаге.

2. **Тонкослойная.**

Когда есть некая пластина, на которой тем или иным образом закреплён сорбент, и процесс хроматографии разворачивается снизу - вверх по сорбенту.

3. **Колоночная.**

Задействуется в большинстве случаев очистки белков.

3) По давлению:

1. **Низкое давление.**

Тогда процесс протекает *самостоятельно*. Мы ставим колонку, размещаем ёмкость, из которой поступает так называемый *элюент* (или жидкость, являющаяся подвижной фазой) сверху к спектру фракций, выходящих из колонки вниз. Имеется разность уровней, и соответственно идёт самотёком хроматографический процесс.

Либо же есть вариант поставить *перистальтический* (или другой) *насос*, который нагнетает давление, но тем не менее оно всё же остаётся достаточно низким.

2. Высокое давление.

Здесь можно отметить HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) и FPLC (Fine Performance Liquid Chromatography). Когда мы говорим о разделении не продуктов реакции, а о разделении белков, то в первую очередь имеется в виду второй метод.

4) По типу сродству к неподвижной и / или подвижной фазам:

Мы рассмотрим четвёртый тип чуть позже и именно применительно к нашим стадиям очистки белков. В частности, когда у нас происходит колоночная жидкостная хроматография нормального или повышенного давления. Здесь будут происходить скорее *аппаратные изменения*, потому что в хроматографии высокого давления колонка достигает обычно нескольких десятков метров и скручена, и поэтому нужны специальные носители, выдерживающие давление.

Перед тем, как перейти к типам хроматографии, давайте посмотрим в самом общем виде, как выглядит **хроматографическая система**. Есть колонка с носиком, в ней есть носитель (гранулы) под слоем *жидкости*. При этом, когда мы набиваем колонку, в большинстве случаев её необходимо *уравновешивать* (встряхивать при укладке). Обычно после того, как растворитель занесли в колонку в виде суспензии, прогоняется 10 объёмов колонки, в результате чего происходит уравнивание и оптимальное распределение носителей.

Кроме того, важно понимать, что носители *различаются по размеру* и бывают очень мелкими, мелкими, средними, большими, очень большими. Соответственно, чем меньше частички носителя, тем *плотнее* он может упаковаться, и тем *больше* будет гидродинамическое *сопротивление* этого слоя носителя текущей сквозь него воде. Сверху надевается некий *адаптер*, от него идёт *шланг* (с насосом, либо же без него), и далее всё выходит в ёмкость, где присутствует та *жидкость*, которая будет пропущена через колонку (либо нанося туда вещество, либо уже снимая его).

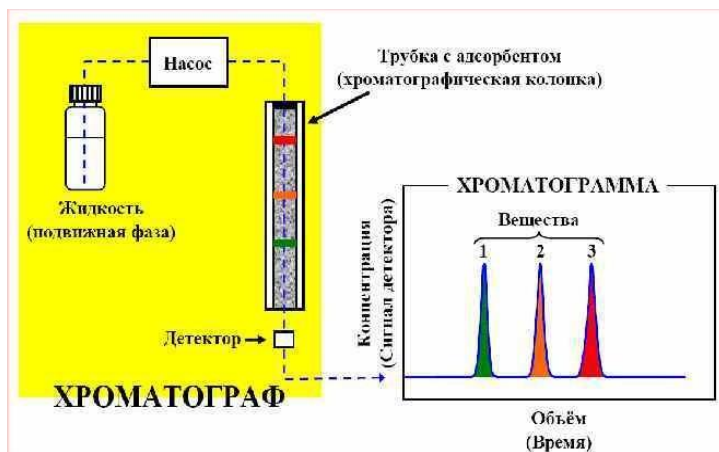


Рис. 19.1. Жидкостной хроматограф

Процесс промывания через колонку называется **элюированием**. Под колонкой часто находится регистратор, который в случае белков чаще всего называется УВИКОРД (некая проточная ячейка, которая измеряет оптическую плотность в ультрафиолете). Далее может быть набор пробирок (в штативе или без) – *коллектор фракций*. Иногда есть также выход на *самописец* (записывающий пики), а также *регистратор ферментативной активности*. Мы говорили, что бессмысленно заниматься очисткой, если у нас нет простого и надёжного способа регистрации активности целевого белка. В специализированных лабораториях в цепочку хроматографической системы могут встраиваться соответствующие измерители.

Типы хроматографии по типам белков

Теперь перейдём к типам хроматографии, которые бывают в случае разделения белков:

1. Гель-фильтрация (гельпроникающая хроматография).

Мы рассматривали её, когда говорили про обессоливание и смену буфера. В подвижной фазе в данном случае будет *жидкость*. В неподвижной фазе – *пористые гранулы*. При этом типа сродства нет, и всё определяется диффузией.

2. Адсорбционная хроматография.

В подвижной фазе будет *жидкость*, а в неподвижной фазе – *твёрдое тело*. Тип сродства – *силы адсорбции*. Это такие *невалентные взаимодействия*, которые могут возникать как внутри белка, так и между белком и носителем.

3. Распределительная хроматография.

В подвижной фазе будет *жидкость*, а в неподвижной фазе – тоже *жидкость*. Тип сродства определяется *коэффициентом распределения*.

4. Ионообменная хроматография.

В подвижной фазе будет *жидкость*, а в неподвижной фазе – *твёрдое тело*. Тип сродства – *электростатические взаимодействия* (закон Кулона).

5. Аффинная хроматография.

В подвижной фазе будет *жидкость*, а в неподвижной фазе – *твёрдое тело*. Тип сродства – *биологическое сродство* (под которым можно понимать пары фермент – ингибитор, антиген – антитело, гормон – рецептор, и т.д.).

Давайте последовательно обсудим все данные типы хроматографии.

Гель-фильтрация

В этом случае мы имеем *пористые гранулы*. В результате образуется внешний объём и внутренний. Если внутри оказывается *маленькая молекула*, она движется сначала вниз, а затем заходит *внутрь гранулы*, где остаётся *неподвижной*. Далее она *выходит*, продолжая свой путь, пока опять не заходит в очередную гранулу. В итоге она запаздывает от фронта элюента. А *большая молекула*, которая не может попасть внутрь гранулы, будет двигаться *между гранулами* и выйдет с фронтом элюента.

Это два крайних случая. Когда *доступен* весь внутренний объём – это, например, *низкомолекулярная соль*, а когда *недоступен* весь объём – это, например, *белок в случае обессоливания*. Но если мы хотим разделять белки, нам надо подобрать поры таким образом, чтобы часть внутреннего объёма была доступна белкам, а часть – нет. Причём тем белкам, которые *крупнее*, должна быть доступна *меньшая* часть внутреннего объёма, а тем, что *помельче* – *большая* часть. Тогда чем *больше* белок, тем меньше времени он будет проводить внутри и *быстрее* выходить с колонки. И соответственно, *меньший* белок будет *запаздывать* сильнее. В этом и заключается основное *разделение*.

Ещё раз стоит подчеркнуть, что здесь мы *не находим никакого сродства*, и всё определяется *размерами* и *продольной диффузией* (насколько часто внутри гранулы оказывается та или иная молекула).

Отчего же будет зависеть эффективность разделения белков?

1) **От скорости элюции.** Если скорость будет слишком *высокой*, белки не успеют пробежать через колонку и разделиться. Если же скорость будет слишком *низкой*, будет осуществляться продольная диффузия, и в результате произойдёт *расширение пиков*, что плохо по двум причинам: во-первых, *пики могут пересечься*, и у нас не будет разделения, а во-вторых произойдёт слишком *большое разбавление*, которое надо будет компенсировать.

2) **От длины колонки.** Если колонка будет слишком *короткой*, то пики *не успеют разделиться*. А если колонка будет слишком *длинной*, то пики *размоются* и могут перекрыться.

3) **От ширины колонки.** Помимо продольной диффузии существует ещё и *поперечная диффузия*, которая может задерживать слишком много гранул, в которые могут попасть молекулы. Соответственно, будут размываться и далеко расходиться пики, и разбавится фермент. Обычно для разделения смеси белков используют *узкие колонки* (а для обессоливания можно использовать любые).

4) *От пористости носителя.* Необходим *правильный диапазон*. Зачастую можно найти в каталоге нужные параметры носителя.

5) *От размера гранул.* Размер создаёт некое *сопротивление* и снижает эффективную *скорость* движения белковой смеси. Это влияет на пункт первый (то есть на скорость элюции).

В любом случае, **гель-фильтрация**, как и другие типы хроматографии, требует *оптимизации* по целому ряду моментов. Зная заранее целевой фермент, можно предположить, с чего следует начинать очистку и какие параметры системы задавать. Но следует *перепроверять* их и проводить *оптимизацию* условий. В случае, если мы не знаем о свойствах искомого фермента, то необходимо набрасывать *экспериментальную сетку*.

Для чего используется гель-фильтрация?

1. Препаративная деятельность

1.1. Обессоливание

1.2. Смена буфера

1.3. Препаративное разделение смеси белков.

2. Аналитическая деятельность

2.1. Определение молекулярной массы белка

Обычно берутся *белки-маркёры* с известной молекулярной массой. Далее они прогоняются через колонку, и строится *зависимость обычного логарифма молекулярной массы от времени выхода* или *от объёма*. И чем больше белок, тем раньше он выйдет, соответственно, получается *нисходящая кривая*, по которой можно выстроить линию *калибровочной зависимости*. Далее можно провести целевой фермент и определить его молекулярную массу.

Конечно, можно всё делать в единой смеси, регистрировать белки-маркёры в одной колонке, и они выйдут все с определёнными пиками в конкретное время. И если у нас есть *регистратор ферментативной активности*, мы узнаем, когда вышел наш целевой белок и сможем обработать всё на графике.

Но есть некая проблема: когда мы говорим о таких процессах, как **гель-фильтрация**, мы должны иметь ввиду **гидродинамический диаметр** (молекула белка постоянно вращается, и фактически мы имеем сферу с диаметром, равным наибольшей полуоси). То есть, нам важна *форма целевого фермента*. Если это сферический фермент, то ничего не произойдёт, но если эллиптический, то мы должны это учитывать. Чем более разные белки будут в калибровке, тем хуже лежат точки на графике. Но можно провести улучшение калибровки переходом к денатурирующим условиям. Например, можно добавить *додecilсульфат натрия*, который придаёт белкам одинаковую форму. Таким образом, наш целевой фермент тоже придётся подвергнуть денатурации, и мы

получим гораздо лучшее схождение точек графика и сможем точнее определить массу. При этом мы потеряем ту часть нашего целевого фермента, которую мы брали для этого.

Распределительная хроматография

На этот вид хроматографии распространяются в принципе те же самые правила, которые характерны и для других типов. Но есть и ряд специфических особенностей. Во-первых, распределительная хроматография может осуществляться в двух типах:

1. **В прямых фазах**
2. **В обращённых фазах**

Чтобы понять, о чём речь, надо вспомнить, что у нас есть *подвижная* и *неподвижная* фазы. В нашем случае в обеих фазах – *жидкости*. Как такое может быть? Во-первых, эти жидкости *не смешиваются*: например, вода и органический растворитель. А дальше всё зависит от того, из какого материала состоят гранулы (в большинстве случаев – не пористая). Если это *полисахаридный носитель*, то гранулы сначала смачивают в воде, заносят в колонку, а в качестве *элюента* используют неполярный органический растворитель. Если у нас *полистирольная гранула*, то смачивают её неполярным органическим растворителем и погружают в колонку, а в качестве элюента используется водно-буферный раствор. Соответственно, получаются *прямые* и *обратные фазы*, и все компоненты различаются по *коэффициенту распределения* (или по гидрофильности / гидрофобности, или по гидрофильно-липофильному балансу): чем *более гидрофобное* вещество мы имеем, тем *больше времени* оно будет проводить в неполярном органическом растворителе, и наоборот. Но в конечном счёте смесь будет *разделена*.

Ионообменная хроматография

Это очень интересная и часто используемая хроматография. Её особенность состоит в том, что твёрдые гранулы модифицируются теми или иными *заряженными группами*. На белке также есть заряженные группы, и если заряды окажутся *противоположными*, то возникнет притяжение (вплоть до того, что белок будет останавливаться на грануле), а если белок *одноимённо* заряжен, то он будет проходить вниз. И здесь возникает масса вариантов.

Давайте выясним, какие бывают типы ионообменников:

1. **Катионообменники** (заряженные отрицательно)
2. **Анионообменники** (заряженные положительно)

И те, и другие могут быть *сильными* и *слабыми*. Мы помним, что *заряженность* зависит от рН, и одна и та же группа при *разных* значениях рН может быть сильно или слабо заряженной. Кроме того, есть значение *pK* (при котором половина групп – *протонированы*, а половина – *депротонированы*). И в ряде случаев, когда у нас

однозарядный ион, можно говорить о заряженности или незаряженности. Так у нас было с карбоксильной группой, а также с аммонийной группой.

Давайте посмотрим на примеры сильных и слабых катионов и анионов, поняв, чем они отличаются. Сильным катионообменником будет $-SO_3$ (*сульфо-группа*), а слабым катионообменником будет $-COO$ (*карбоксильная группа*). Сильным анионообменником будет $C_2H_5-N-2(C_2H_5)$ (*диэтиламиноэтил*), а слабым анионообменником будет $C_2H_5-N(+)-3(C_2H_5)$ (*триэтиламиноэтил*). Соответственно, *сильные* ионообменники заряжены в *широком* диапазоне значений pH, а *слабые* – в более узком.

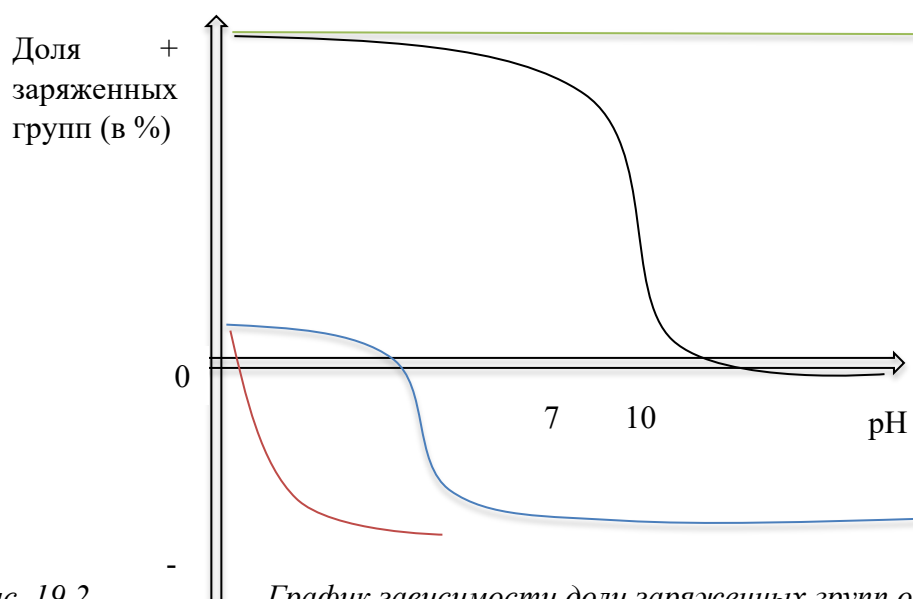


Рис. 19.2. График зависимости доли заряженных групп от значений pH

Давайте возьмём *слабый катионообменник* карбоксильной группы (синяя кривая на Рис. 19.2.). Мы помним, что $pH = 4$, и в этом случае группа является незаряженной. А в случае *сульфо-группы* (красная кривая на Рис. 19.2.) график будет выглядеть иначе: *отрицательный* заряд будет в *более широком* диапазоне.

В случае *анионообменников* ситуация будет немного иной. *Слабый* анионообменник имеет pK в районе 10, соответственно, заряженные будут *при pH ниже pK* (чёрная кривая на Рис. 19.2.). *Сильный* анионообменник будет *заряжен во всём диапазоне* (зелёная прямая на Рис. 19.2.).

Какие же ионообменники используются чаще? *Слабые* катионообменники и анионообменники. Почему? Представьте себе, что у нас есть белок, который *движется*, и есть гранулы, на которых жёстко зафиксированы заряды. Если этих зарядов много, и они полностью целочисленные, да ещё и не очень высокая ионная среда, то надо реализовывать каждый *электростатический* контакт. Но если *неоптимальные* расстояния, то придётся двигать заряды (на белках, потому что гранулы неподвижны), и такое изменение структурной организации белка – это *денатурация*. То есть, если мы используем *сильнозаряженный сильный ионообменник*, то существует опасность

инактивации целевого фермента. В то же время, *правильно подбирая носитель и диапазон рН*, мы можем создать ситуацию, когда *лишь слабая группа* ионообменника заряжена. Отдельно обращаю внимание, что эта щепетильность касается только *целевого фермента*, в то время как балластные белки могут быть денатурированы без опаски.

Ионообменная хроматография состоит из двух этапов:

1) Посадка.

Обычно подбирают рН таким образом, чтобы он отличался от *изоэлектрической* точки нашего целевого белка не более чем на 1,5-2 единицы, чтобы *не допустить* слишком сильного связывания с носителем. В данном случае рН посадки определяется таким образом, чтобы какие-то белки отправить в проскок. При этом желательно, чтобы уже на этой стадии некоторая часть балластных белков была отведена от целевого белка.

Ещё важно, что метод ионообменной хроматографии можно использовать для *концентрирования*. Например, если в ходе гель-фильтрации мы очень сильно разбавили состав, то можно не прибегать к ультрафильтрации, а задействовать ионный обмен.

2) Элюирование (элюция).

Как снимать белок с колонки? Можно *изменить рН*, то есть взять другой буфер. Делается это только тогда, когда у нас *немного белков* в смеси, и *мы знаем об их свойствах*. Если же мы выделяем белки из реальных биологических объектов, их свойства недостаточно определены, поэтому чаще используется *увеличение ионной силы*. За счёт *электростатических взаимодействий* белки связались с носителем в колонке. Чем ниже ионная сила, тем сильнее эти взаимодействия. Соответственно, **чем выше концентрация низкомолекулярного электролита, тем слабее электростатика.**

Есть так называемое **изократическое повышение** (при постоянной ионной силе). Это не слишком хороший вариант, потому что наиболее прочно связанных белков придётся ждать *довольно долго*, и при этом они могут уже частично *разбавиться* и потерять часть активности.

Но существует также **градиентное повышение** ионной силы с помощью двух способов:

1. *Ступенчатое*

2. *Линейное*

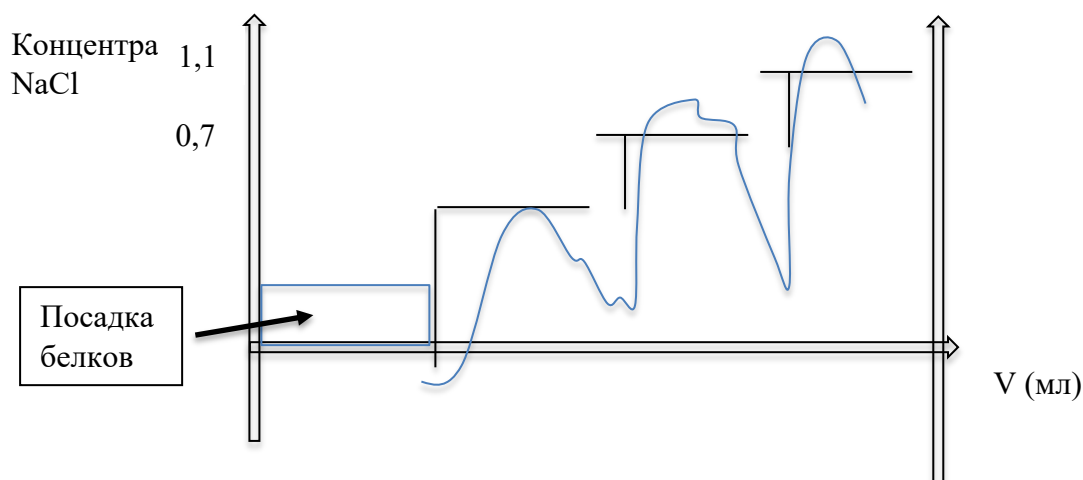


Рис. 19.3. График ступенчатого градиентного повышения ионной силы

Мы можем *поменять буфер и ступенчато изменять* градиент. Допустим, 0,4 – 0,7 – 1,1. Что-то мы поделим, но скорее всего это будет *не оптимально*, потому что мы у нас только три буфера, и внутри пиков хорошего разделения не произойдет. Поэтому лучше использовать другую систему:

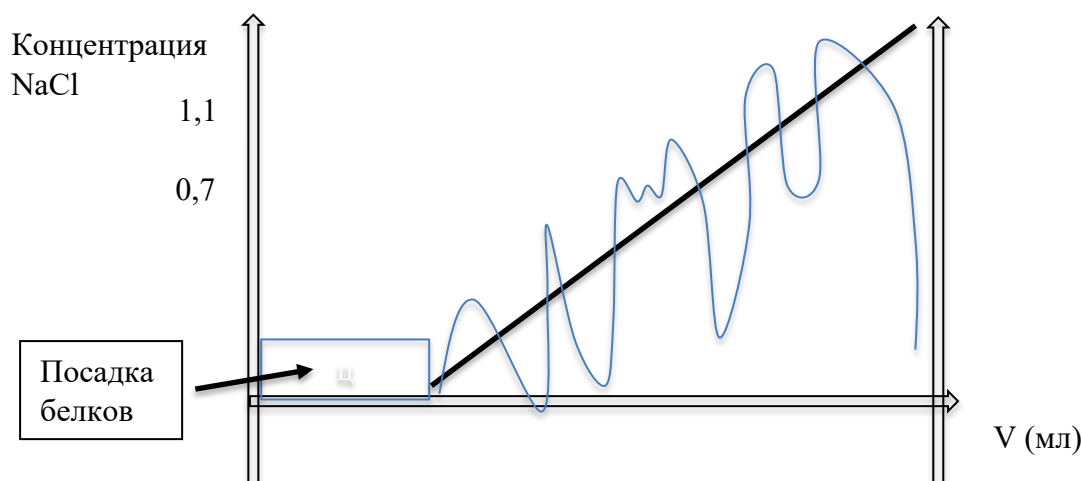
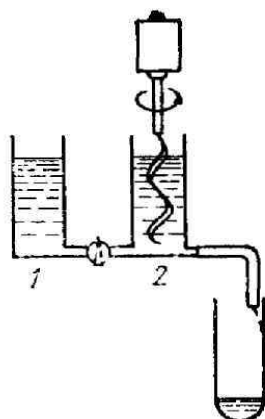


Рис. 19.4. График линейного градиентного повышения ионной силы

Мы до единицы устраиваем *линейный градиент* натрий-хлора. В результате белки, которые связаны наиболее прочно, выйдут при более высоких концентрациях, а те, что связаны менее прочно – при более низких. Произойдет правильное осаждение. При этом необходимо *проверить активность*, чтобы понять в какой *фракции* находится наш *целевой фермент*.

Получать линейный градиент позволяет *миксер* в электронном или механическом исполнении. Это *две ёмкости*, перевязанные между собой. В один наливается 0,1-молярный NaCl, а в другой – 1-молярный NaCl. Есть магнитная *мешалка*, и выходит более *концентрированная смесь*.



Устройство для создания
линейного градиента
плотности раствора.

1 – резервуар
2 – смеситель

Рис. 19.4. Получение линейного градиента

Ионообменная хроматография задается очень часто с самыми разными носителями.

Аффинная хроматография

Этот тип хроматографии предполагает *биологическое сродство*. В случае пары фермент – ингибитор, наш *целевой фермент* цепляется за ингибитор, который пришит к колонке, а остальные белки проходят мимо. Потом мы добавляем некоторый *агент* (низкомолекулярную соль или полиатомный спирт), тем самым снимая связавшийся фермент с колонки фактически за одну стадию с высокой степенью очистки и выхода.

Надо сказать, что в этом случае очень *высокие константы связывания* (больше или равно 10 в -9 степени). И определяется это *геометрическим соответствием* центра связывания и связываемой молекулы. Естественно, это соответствие подкрепляется *невалентными взаимодействиями*. Кажется, что этот метод во всем хорош, но здесь тоже есть свои нюансы. Если нет продажных *аффинных колонок*, то создание может отнять очень много времени.

Отдельно надо сказать о **групповой аффинности**. Например, на колонке можно создать некий связывающий углеводы центр, и далее отделить все гликопротеины от не гликопротеинов. Подытоживая этот разговор, стоит сказать, что все перечисленные методы позволяют как по отдельности, так и в комбинациях существенно почистить целевой белок.

Электрофоретические методы

Этот метод основан на взаимодействии белков с электрическим полем. В общем-то есть две главные модификации этого метода:

1. Электрофорез.

Представим себе некоторую ванну, наполненную белковой жидкостью. Допустим, там есть *положительный* и *отрицательный* заряд. Цепь замкнулась, пошел ток, а значит белки должны начать *движение*. От чего зависит это движение? От соотношения pH и

pI . Если pH меньше pI , то белок заряжен суммарно *положительно* и пойдёт к *минусу*. Если же pH выше pI , то белок заряжен суммарно *отрицательно* и пойдёт к *плюсу*. Если pH равен pI , то белок останется на месте. Казалось бы, это идеальная ситуация.

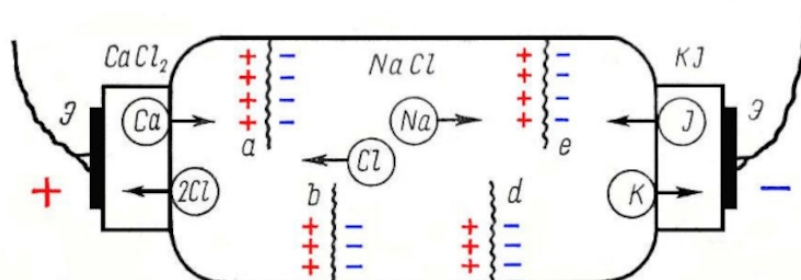


Рис. 19.5. Схема электрофореза

Однако, на практике есть *диффузия* в жидкой среде, которая постоянно *размазывает* эти полосы жидких белков, и чёткости мы не получим. Вопрос в том, чтобы проводить электрофоретические манипуляции в *геле* => **гель-электрофорез**. Мы заливаем белковый раствор в гелевую пластинку, по дорожкам которой побегут белки. Допустим, мы запустили туда белки, и тогда начнётся движение, определяющим параметром которого будет **электрофоретическая подвижность**. От чего она зависит? В первую очередь от геля, потому что белок движется внутри него и натывается на полимерные цепочки. Часто используют *полиакриламидный* гель. Есть возможность регулировать *ширину пор геля*, чтобы подстраиваться под белки с разной подвижностью.

Здесь важна **плотность заряда на поверхности**: чем *выше* поверхностный заряд, тем *быстрее* будет двигаться белок. Кроме того, важна **молекулярная масса**: чем *больше* белок, тем *медленнее* он будет пробираться через полимерные цепочки. И наконец важна **форма белка**: чем более *эллиптической* будет форма, тем больше *трудностей* будет при движении.

Для чего используется этот метод? Есть две опции:

1) **Препаративная деятельность**. Действительно, можно использовать гель-электрофорез для *разделения* белков, вырезая кусочки геля с последующим *экстрагированием* целевого фермента.

2) **Аналитическая деятельность**:

2.2.) **Молекулярная масса**. На первой дорожке запускают *белки-маркёры* (под определённую массу). Если наш белок в том же диапазоне, мы получим для него нужное значение. Здесь белки тоже сильно различаются по форме, и это осложняет определение. В случае препаративной стадии мы осуществляем *нативный электрофорез*, в данном случае возможен *денатурирующий электрофорез*.

Происходит интересное событие: *додецилсульфат натрия* и некоторые другие агенты являются одновременно и *детергентом*, и *денатурантом*. При его добавлении

происходит *разворачивание* белка. При этом значительная часть *гидрофобных* участков выходит на поверхность. Среднестатистические белки имеют примерно 50% кислотных остатков, содержащих боковые заместители. То есть, у нас получается некий набор *эллиптических* структур, у которых *одинаковая* доля поверхности занята *гидрофобными* участками. Это денатурирующая способность.

Додецилсульфат натрия имеет сульфо-группы в виде хвостов, которые заклепывают *гидрофобные* области, а снаружи торчат *отрицательные* заряды. Причём чем больше этих областей, тем *больше* отрицательных зарядов. Но *плотность* заряда на поверхности становится *одинаковой*. И мы получаем набор конгруэнтных фигур с одинаковыми свойствами, у которых электрофоретическая подвижность будет зависеть только от размеров (то есть от молекулярной массы). Мы можем, таким образом, получить гораздо более определённую картинку.

Если говорить о различиях, то в случае *гель-фильтрации* первыми с колонки сходят самые *большие* белки, а самые малые выходят последними. В случае *электрофореза* всё происходит наоборот: *первыми* выходят *меньшие* белки (которые быстрее идут по пластине геля). В случае электрофореза белки *идут внутри* геля и цепляются за полимерные цепи, а в случае *гель-фильтрации* белки *движутся только вне* гранул.

2.3.) *Степень гомогенности*. По каждой дорожке запускают *разные стадии*. На каждой стадии отбираются пробы, и запускают *электрофоретический* процесс. Чистота полос постепенно повышается.

2. Изоэлектрофокусирование.

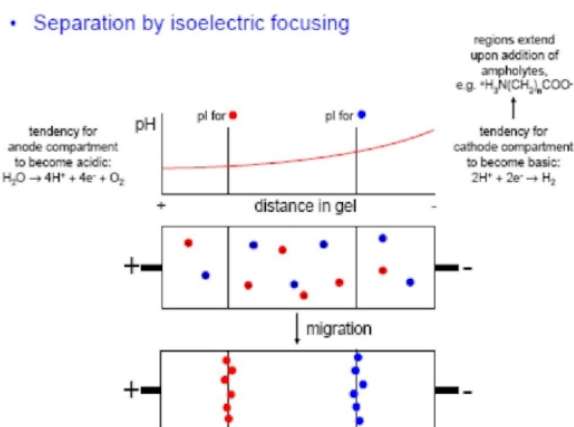


Рис. 19.6. Схема изоэлектрофокусирования

В данном случае мы также имеем *пластинку геля* с дорожками. При этом мы заносим сюда много разных *амфолинов*. Это *олигомеры*, которые различаются количеством $-NH_3(+)$ и $CO(-)$ групп. Они являются буферами при pI . Иными словами, в точке *электронейтральности* они поддерживают внутри себя тот pH , который равен их pI . В результате, амфолины начинают *сильно двигаться*. Отрицательно заряженные идут

к *плюсу*, а положительно заряженные идут к *минусу*. В конечном счёте, движение происходит до той поры, пока за счёт контактов со своими соседями они не окажутся при таком значении pH , которое равняется pI . Амфолины выстраиваются по своим pI , и у нас получается *шкала pH* .

При этом мы можем занести сюда *большой* белок, который суммарно *отрицательно заряжен* и имеет pI достаточно *низкий*. Соответственно, он будет идти медленно, пока не дойдёт до *равного* pI значения pH . Но у белка есть некая *инерция*, которая толкает белок в другую сторону. Такими скачками он будет стремиться к своему значению pI . Таким образом, методом изоэлектрофокусирования можно определять pI белков (что необходимо для того, чтобы производить ионообменную хроматографию).

Соответственно, применение данного метода предполагает два варианта:

1) **Препаративная деятельность.** Это стадия *очистки* белков. Далее можно также вырезать фракции и собирать гель с *целевым ферментом*.

2) **Аналитическая деятельность:**

2.1.) **Определение изоэлектрической точки.** Сделав это, можно гораздо более эффективно и целенаправленно провести стадию ионообменной хроматографии.

2.2.) **Степень гомогенности.** Получается достаточно чёткие полосы белков.

Лекция 20. Фибриллярные белки.

Сегодня мы отойдём от мира глобулярных белков, которые мы обсуждали почти с самого начала курса, и поговорим о мире **фибриллярных белков**. Мы неоднократно упоминали, что *глобулярные белки* – это такие биомолекулы, у которых по трём измерениям (по осям эллипсоида) *размеры принадлежат к одному порядку*: это либо *сфера*, либо *эллипсоид*. В противовес этому, фибриллярные белки представляют собой либо *стержни* (тогда одно измерение существенно превосходит два других), либо *плёнки* или *слои* (и тогда два измерения существенно меньше третьего).

Мир фибриллярных белков очень разнообразен, и по массе, которая приходится на их долю, они, скорее всего, превосходят глобулярные. Мы уделяли большое внимание именно глобулярным белкам, поскольку нас интересовали **ферменты**. Но тем не менее, надо рассмотреть и фибриллярные белки, потому что они являются важными *структурными компонентами*.

Ключевые примеры фибриллярных белков

Подчеркну ещё раз, что существует *очень много* фибриллярных белков. Мы рассмотрим самые хорошо изученные из них и попробуем на их примере увидеть свойства, присущие фибриллярным белкам. И начнём мы с **альфа-кератина** (который является основным компонентом волос и шерсти). Что можно сказать об этом белке? Это практически полностью *альфа-спираль*, поэтому надо удерживать в голове, что альфа-спирали в случае глобулярных белков *закручены вправо* (потому что мы имеем L-аминокислоты, и боковые заместители смотрят наружу). Существуют эти спирали за счёт *водородных связей* между СО- и NH-группами полипептидного остова (вторичные структуры), которые располагаются на одном уровне (линейные). При этом на один виток приходится 3,6 остатка. Получается, что линия водородных связей и ось спирали образуют *скрещивающиеся прямые*: то есть водородные связи с одной стороны линейны, а с другой – располагаются под неким углом к оси спирали.

Важно отметить, что альфа-спирали – самые *выгодные, распространённые и стабильные* среди вторичных структур (по сравнению с *β-спиралями* и *3/10 спиралями*), и наряду с *отсутствием стерических затруднений* и *линейностью водородных связей*, к преимуществам их следует также отнести *диаметр*, который соответствует оптимум дисперсионных сил притяжения. У альфа-спирали альфа-кератина есть определённые *особенности аминокислотного состава*. Во-первых, в нём не может присутствовать много *пролина*. Во-вторых, в нём *высокое содержание гидрофобных боковых заместителей*: это проявляется, когда мы моем голову в душе (волосы не растворяются). Также следует отметить высокое содержание остатков цистеина: всё дело в том, что альфа-спирали особым образом упакованы. У нас фактически получается система канатов, когда отдельные спирали закручиваются, потому несколько закрученных

элементов скручиваются ещё раз, и получается *прочная структура*, и вдоль оси спирали она поддерживается за счёт водородных связей (Рис. 20.1.)

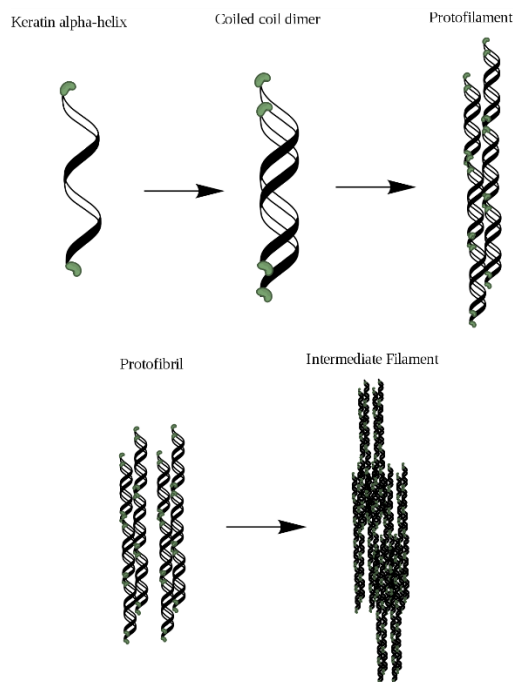


Рис. 20.1. Образование альфа-кератина

Но при этом ничего не фиксирует эти структуры относительно друг друга, и, если бы не было *цистеина*, они бы перемещались. Фактически, в альфа-кератине остатки не цистеина, а *цистина*, то есть SH-группы в остатке цистеина участвуют в образовании межцепочечных *дисульфидных мостиков*, которые закрепляют структуру и не позволяют отдельным фибриллам или филаментам двигаться. И чем *больше* остатков цистеина, тем более *прочным* получается коллагеновое волокно. В волосах это порядка 5%, а в панцире черепахи – 18%.

Заканчивая беседу об альфа-кератине, можно в двух словах рассказать о перманентной завивке. Это процесс, который изменяет визуальную причёску, и это изменение держится довольно длительный период. Мы хотим либо закрутить прямые волосы, либо закрепить закрученные. Что для этого нужно сделать? Нужно *разрушить водородные связи*, которые удерживают исходную структуру (мы проводим *нагревание*). Также нужно *разрушить дисульфидные мостики* (для этого мы используем *восстанавливающие агенты*). Далее подготовленные волосы накручиваются на бигуди, и таким образом *вытягиваются* спиральные образования в более прямолинейные цепочки. После этого нам надо *восстановить* скрепляющие связи. Соответственно, мы добавляем *окислитель*, и восстанавливаются SS-связи, которые держат между собой цепочки. И также мы охлаждаем систему, где налаживается новый набор водородных связей.

Что важно? Когда мы вытянули множество альфа-спиралей, они оказались в одной плоскости. При этом альфа-спираль практически переходит в бета-лист, где новые водородные связи, как и дисульфидные мостики образуются в проекции листа. Такой переход из альфа-спирали в бета-лист был подтверждён периодичностью в случае альфа-спирали – 5,4 ангстрема (аксиальный подъём на один виток), а в случае бета-листа – 7 ангстрем.

Следующий фибриллярный белок – **бета-фиброин шёлка**. Можно отметить, что эту исключительно *гибкую* ткань производят шелкопряды, используя при этом определённый вид растений (например, тутовник). В результате получается некое волокно, которое состоит из белка бета-фиброина, который представляет собой *бета-складчатый лист*. К особенностям аминокислотного состава следует отнести *высокое содержание глицина и аланина*. Мы уже говорили о том, что *глицин* – это кислота-исключение, потому что у него очень *маленький боковой заместитель* (водород), и *нет стерических затруднений*. Таким образом, свойство *повышенной гибкости* передаётся на макроуровень.

Следующий белок – **коллаген**. Он представлен в качестве основного компонента органической составляющей *костей*, а также в составе *кожи*. Коллаген представляет из себя весьма интересное образование с хитрым аминокислотным составом. К особенностям коллагена относится высокое содержание *пролина* и *гидроксипролина*: суммарно на их долю приходится порядка 25%. Кроме того, присутствует 30% *глицина*, а также *лизин* и *5-гидроксилизин*.

Индивидуальная цепочка коллагена существует в виде *спирали*. При этом важно заметить, что это не альфа-спираль. Отличительной особенностью альфа-спиралей является наличие поддерживающих её *водородных связей*. Но в данном случае спирализация происходит *за счёт жёсткости колец* пролина и гидроксипролина: они настолько жёсткие, что пытаются оттолкнуться друг от друга, что приводит к снижению энергии всей цепочки. При этом параметры самой спирали (*диаметр, количество остатков на виток*) более-менее сравнимы с тем, что есть в альфа-спиралях, но основной движущей силой выступают *жёсткие кольца пролина*.

Далее следует сказать, что коллаген не существует в виде индивидуальной цепочки. Основной структурный компонент здесь – *тропоколлаген* (скрученная тройная спираль).

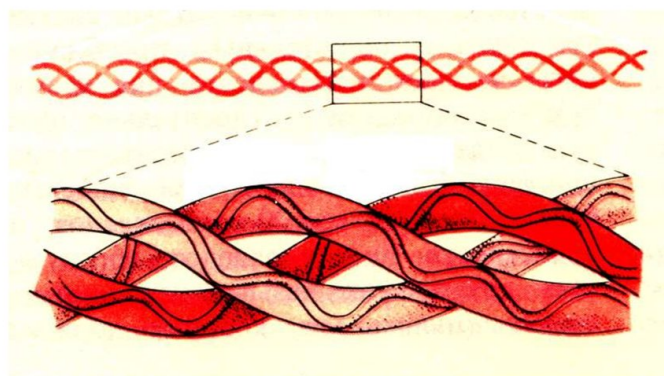


Рис. 20.2. Участок молекулы коллагена

В каждой спирали *каждый третий остаток* становится как бы *зажатым* между двумя другими спиралями. Соответственно, места между двумя спиралями довольно *мало*, и потому там может разместиться только *глицин* (из-за малого размера бокового заместителя).

Схематически можно представить, что между вытянутыми фрагментами тропоколлагена находятся остатки *фосфата кальция* (модификация гидроксиапатита). Соответственно, коллаген уложен стопочками с некоторыми сдвигами. Мы приходим к пониманию того, что нам необходимо, как и в случае волос (где нужно было закреплять кератиновые цепочки), закреплять цепочки тропоколлагена. На помощь приходит *гидроксипролин* и *лизин*. Гидроксипролин – *неканоническая* аминокислота, которая получается в результате *посттрансляционной модификации* (то есть, у него нет кодирующего его непосредственно триплета, и он не включается в текущий белок). После трансляции возникают ОН-группы, которые используются для создания *межцепочечных водородных связей*, что приводит к *созреванию коллагенового волокна* (получаются прочные структуры). В процессе *гидроксилирования* пролина задействован витамин С.

Собственно, реакция идёт *диоксигеназно*: суть реакции состоит в том, что происходит окислительное декарбоксилирование, со включением одного из атомов кислорода в пролин (задействуется при этом фермент *пролин-оксидаза*, имеющая в активе железно-серный кластер), в результате чего атом железа меняет степень окисления с +2 на -3. Требуется восстановление железа, где включается *аскорбиновая кислота*. Можно отметить, что в большинстве случаев витамины участвуют в биокаталитических процессах, и по окончании цикла, как и любой катализатор, они восстанавливают свою исходную

витамины С восстанавливают железо, сам переходит в окисленную форму и в таком виде выводится из организма. Соответственно, в рационе человека потребность в витамине С на 2-3 порядка выше, чем потребность в других витаминах.

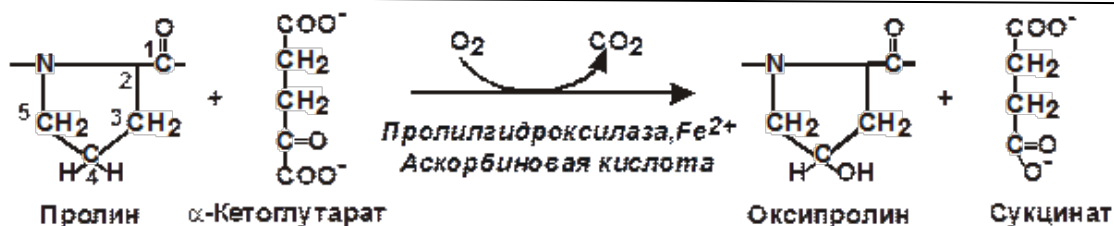


Рис. 20.3. Реакция декарбоксилирования пролина

Основой процесса работы таких железосерных кластеров является окислительно-восстановительный процесс. Витамин С окисляется, образуя окисленную форму.

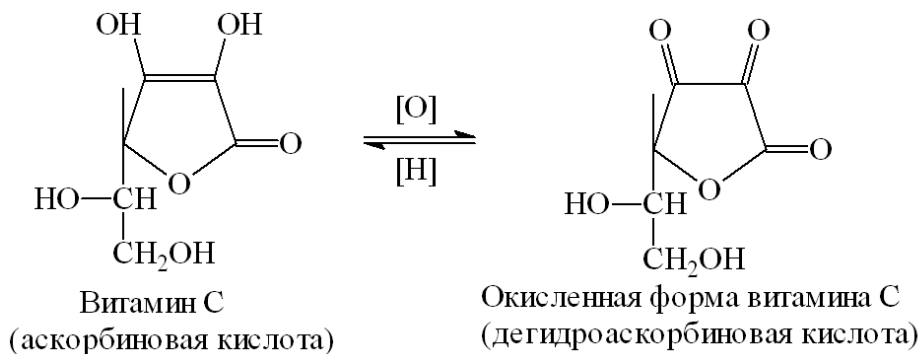


Рис. 20.4. Реакция окисления витамина С

Помимо пролина, гидроксипролина и глицина, есть ещё лизин. Боковой заместителем последнего представляет собой четыре метиленовых группы и аммонийную группу на конце. Предположить образование, например, амидных связей не очень просто в этой ситуации (потому что требуются конденсирующие агенты). Но есть реакция *трансаминирования*, которая может показаться странностью, но тем не менее, механизм её довольно понятен: он идёт при помощи производных витамина С (при помощи пиридоксина, который присутствует в двух формах), в несколько стадий с образованием и разрывом оснований Шиффа, с перемещением двойной связи. В результате получается, что альфа-кетокислота, и альфа-аминокислота с разными боковыми заместителями как бы обмениваются ими.

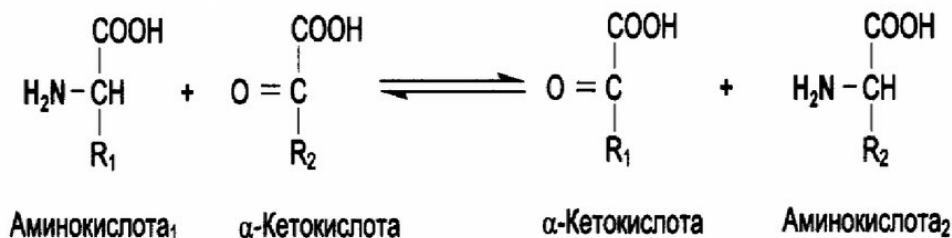


Рис. 20.4. Реакция трансаминирования для альфа-положения

В лизине боковые заместители находятся в *эпсилон-положении*, но в принципе, это ничего не меняет. Таким образом, мы переходим от бокового заместителя,

содержащего азот, к боковому заместителю с *карбонильной группой*. Это соединение называется *альдолизин*. Этот белок открывает достаточно богатую химию для образования межцепочечных сшивок, причём не из невалентных связей (таких, как водородная связь), а уже из ковалентных связей. То есть, если встретится фрагмент цепочки с *остатком лизина* – с одной стороны, и фрагмент с *остатком альдолизина* – с другой, то они могут образовать *основание Шиффа* (или азометиновую связь).

Эта ковалентная связь является не очень стабильной, её образование обратимо, и она чувствительна к рН. Что можно сделать? В принципе, её можно восстановить. Реакция образования основания Шиффа очень активно используется в *препаративной химии белков* (при модификации, при мобилизации, в иммунно-ферментном анализе). Если в лаборатории для этого используется боргидрит, то в организме есть такие варианты, как *никотинамид-динуклеотидфосфат*. В результате мы имеем одинарную CN-связь и прочную ковалентную сшивку.

Более того, могут встретиться *два альдолизина*, и между ними тоже возможна реакция. И в этом случае будет протекать *конденсация*. Она может идти до двойной связи, а может идти и без отщепления воды. Если сюда же подойдёт боковой заместитель какой-то аминокислоты, содержащей аминогруппу (это может быть *лизин, аргинин и гистидин*), то возможна *сшивка трёх цепей*. Всё это нужно для образования зрелого коллагенового волокна. Если в организме *недостаточно* витамина С, то это чревато болезнью *цинги*. В этом случае как раз прекращается выработка зрелого коллагенового волокна, что приводит к хрупкости костной ткани и кожи.

Возвращаемся к теме. Хочется подчеркнуть, что до некоторой поры всё происходит в стадии *проколлагена*. Сначала трансляция, происходит *гидроксилирование индивидуальных цепочек*, после чего эти цепочки встречаются и образуют двойную спираль (в которой есть *области глобулярности*, причём с одной из сторон образуются *дисульфидные связи*). В какой-то момент происходит ещё одна модификация по гидроксизину (появляются остатки каких-то олигосахаридов). Гидроксилированные неканонические аминокислоты играют разные роли: если *гидроксипролин* отвечает за образование межцепочечных водородных связей, то *гидроксизин* необходим для модификации углеводами и для придания некоторых *макросвойств* (например, смачиваемости водой), которые присущи волокну в целом. Мы понимаем, что кожа и кости – весьма разные по свойствам образования. И в каком-то смысле этими различиями они обязаны *разным модификациям углеводами*.

После того, как происходит эта модификация, идёт *гидролиз глобулярных концевых участков*, и остаётся уже правильная готовая *тропоколлагеновая единица*, которая дальше начинает объединяться в *стопочные структуры*. Надо заметить, что в организме присутствует существенно разное количество *ферментов-коллагеназ*, которые расщепляют коллаген. Более того, некоторые организмы защищаются выработкой коллагеназы, разлагающей коллаген агрессора.

Последнее, что нужно заметить здесь – плохая растворимость коллагена. Если его долго вываривать, получится *студень*. Его также можно сделать, купив желатин. Так вот, *желатин* – это продукт частичного *гидролиза коллагена*, который можно получить, используя коллаген естественный (который мы сами превращаем в желатин), а можно воспользоваться заводским продуктом.

Ещё один фибриллярный белок – *эластин*, компонент связок. Связки очень важны и играют роль *полимера*, который может находиться под определённой *нагрузкой*. Это достигается большим количеством лабильных растягивающихся участков (здесь достаточно много *глицина*), но есть также и большое количество связок: различные молекулы эластина *сшиваются*. Причём, сшивки бывают *двухцепочечные*, *трёхцепочечные* и *четырёхцепочечные* (благодаря химии альдолизина).

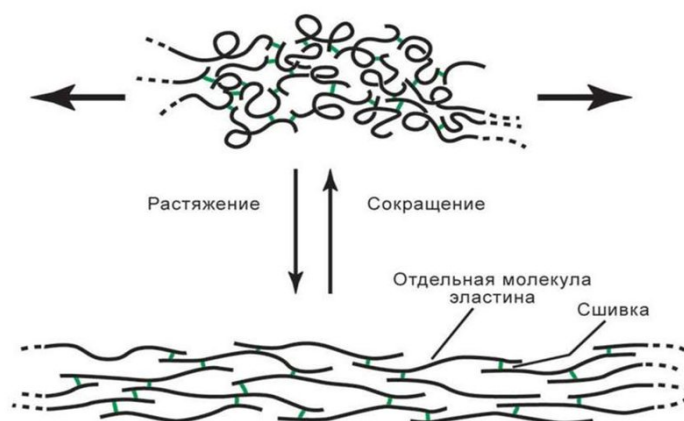


Рис. 20.5. Молекула эластина

Из четырёх лизиновых остатков через частичное превращение в альдолизин получается остаток *десмозина* (Рис. 20.6.). Фактически, в нём есть часть остатков пиридина, что довольно странно, поскольку пиридин не совсем совместим с живыми системами. Тем не менее, в организме можно найти множество его производных.

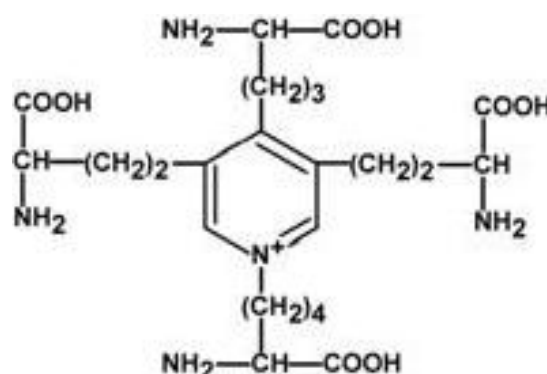


Рис. 20.5. Десмозин

Надо немного сказать о *мышечном сокращении*. На самом деле, здесь много разных белков. Основные из них – *актин* и *миозин* (но также есть *тропанин*, *миозин-связывающие белки*). Мышечное сокращение осуществляется за счёт *гидролиза АТФ*. Мы

для себя должны отметить два вышеперечисленных компонента. Актин бывает двух типов: *F-актин* (фибрилярный) и *G-актин* (глобулярный). Глобулярный актин – это небольшой белок (молекулярной массой порядка 40 килодальтон), который образует вытянутые агрегаты (фактически двойную суперспираль). Далее актин образует *тонкие* нити, а *толстые* нити образуются из *миозина* (очень длинная спираль). Но при этом у миозина есть ещё и глобулярный участок, в котором и происходит гидролиз АТФ. Противоречия здесь нет (казалось бы, речь о фибриллярных белках), потому что для осуществления ферментативной функции образуется *глобулярная головка*.

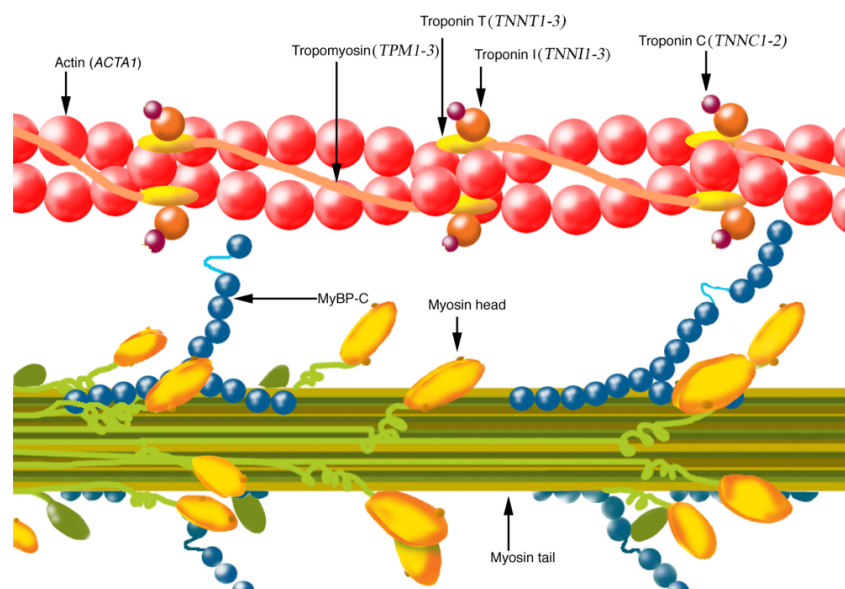


Рис. 20.6. Актин-миозиновый комплекс

Стоит подчеркнуть, что есть *тяжёлые* и *лёгкие* цепи миозина. На самом деле всё это довольно сложно работает. Уже в курсе *биохимии*, после изучения процессов, связанных с наработкой энергии, с её хранением и реализацией, мы уже подробнее обратимся к мышечному сокращению.

Подытоживая наш разговор, хотелось бы показать *протеогликановый агрегат*. Мы разбирали его, когда говорили об углеводах. Есть два типа структур, которые состоят из остатков белков и углеводов:

- 1) **Гликопротеины** (большая часть массы приходится на белок, модифицированный остатками углеводов).
- 2) **Протеогликаны** (большая часть массы приходится на углеводы – 95%).

В случае протеогликанов мы имеем основной компонент *хряща*. Есть центральная гиалуроновая кислота, к которой через связывающий белок прикрепляются поровые белки, а дальше снова – производные углеводов (*глюкозаминогликаны*). Все они представляют из себя *димеры*, в которых одно из мономерных звеньев – это производная *глюкозамина* (или какого-то другого аминоксодержащего сахара – Рис. 20.7.). Но

несмотря на наличие *азотосодержащих групп*, они все *модифицированы*. Бывают самые разные варианты.

В результате этого, на глюкозаминогликаны нет положительных зарядов. В то же время, в них много отрицательно заряженных групп (карбоксильных, или сульфо-групп). Поэтому это всё-таки полианионы с большим количеством соответствующих групп (связывающих большое количество воды), а так как на их долю приходится почти вся масса, то и в целом в хряще обнаруживается *гелеобразная структура*.

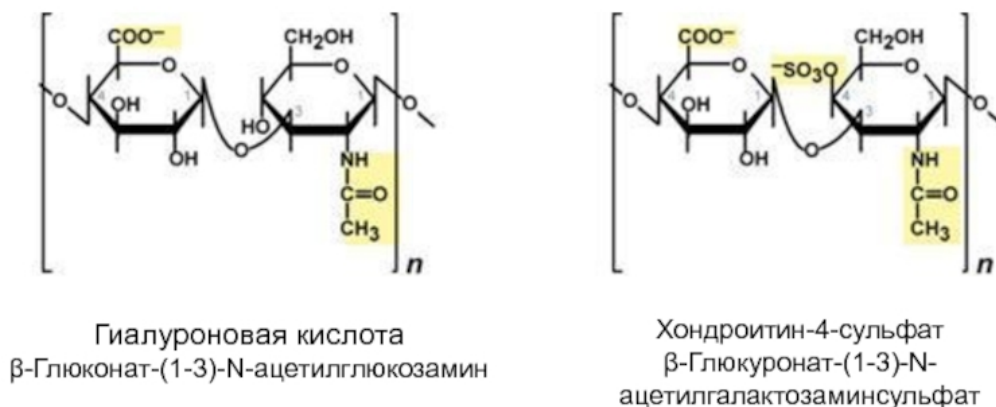


Рис. 20.7. Глюкозамингликаны

На этом мы закончим экскурсию в мир фибриллярных белках. Я надеюсь, что нам удалось познакомиться с некоторыми *различиями*, которые есть по отношению к глобулярным белкам. *Здесь не так много ферментативных процессов*, и если они есть, то это как раз – фрагменты глобулярности. Но здесь наблюдаются очень интересные структуры, которые крайне важны для жизнедеятельности организмов.

Лекция 21. Липиды. Мембраны.

Сегодня мы разберём очень важный класс соединений – **липиды**, а также поговорим о тех ансамблях, которые получаются на их основе. В частности, это **биомембраны**. Если говорить о липидах с точки зрения структуры, то можно сказать, что это очень разнородный класс соединений.

Классификация липидов

Мы уже определяли **белки** как последовательности аминокислотных остатков, соединённых пептидной связью. То же самое мы скоро сможем сказать о **нуклеотидах**, только там будут остатки мононуклеотидов, а вместо пептидной связи будут фосфодиэфирные связи. Когда мы обсуждали углеводы, мы вывели их общую формулу $C_n(H_2O)_m$. В данном случае же *невозможно как-то описать их структурно*, потому что это крайне разнообразный класс. Поэтому объединяют их по свойствам.

Липиды – вещества неполярной или амфифильной природы с низкой растворимостью в воде.

Классификации липидов бывают разными:

1. Простые липиды

- А) *Воска*
- Б) *Триацилглицериды* (жиры и масла)

2. Сложные липиды

- А) *Фосфоглицериды*
- Б) *Сфинголипиды* (включая гликолипиды)

3. Стероиды

4. Липопротеины

5. Жирорастворимые витамины

6. Вещества – предшественники

7) *Изопреноиды*

Этот список можно и продолжить, но мы остановимся на самых основных, понимая, что классификация весьма условна.

Давайте начнём с простых липидов. Итак, **воск** – это остаток *жирной кислоты* (длинноцепочечная карбоновая кислота) и остаток *алифатического спирта*. Воск крайне гидрофобное вещество, которое выполняет *строительную* (все мы знаем про пчелиные соты), *лечебную, защитную функции* (многие растения покрывают плоды слоем воска). Как только появляется такое соединение, которое состоит из *трёх атомов углерода, водорода и кислорода*, всегда находятся желающие ими питаться.

Мы переходим к **триацилглицеридам**. Из чего же они построены? В первую очередь, вспомним про глицерин. Это *трёхатомный спирт*, имеющий очень *симметричную молекулу (ахиральную)*.

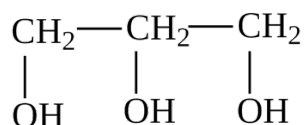


Рис. 21.1. Глицерин

Если мы начинаем рассматривать производные глицерина, то получается, что центральный атом углерода содержит четыре разных заместителя: водород, хвост, соединённый с OH-группой, и две группы, в которых сложноэфирная связь отделена CH₂-группой. Получается *хиральное соединение*, обладающее *оптической активностью* (то есть, возникает асимметрический центр углерода). И если мы будем говорить о глицерине с точки зрения хиральности, то с позиции образования триацилглицерида глицерин, безусловно, *прохиральное соединение*.

Правильно записанная производная глицерина будет выглядеть следующим образом:

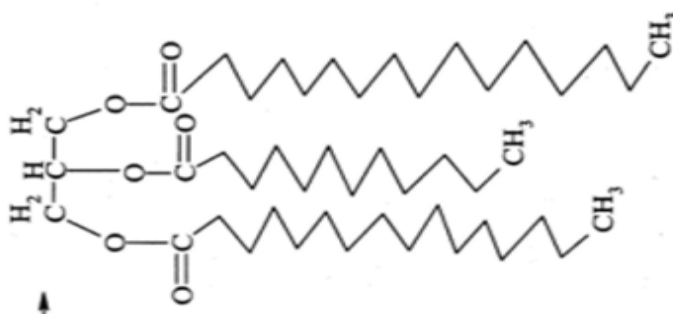


Рис. 21.2. Производная глицерина

В проекции Фишера (на плоскости) два крайних хвоста будут смотреть вправо, а средний хвост – влево. В таком виде производной глицерин называют производной *стереохимически нормализованного глицерина*. Другим компонентом триацилглицеридов являются остатки жирных кислот. Начинаем мы с предельных (то есть, не содержащих кратные связи) монокарбоновых кислот. Первые три (*муравьиная, уксусная, пропионовая*) не встречаются в них, а начиная с четвёртой – могут появляться:

- *Валериановая*
- *Капроновая*
- *Каприловая*
- *Каприоновая*
- *Лауриновая*
- *Миристиновая*
- *Пальмитиновая*

- *Стеариновая*
- *Арахидиновая*

Главные жирные кислоты, которые оказываются в составе диацил- и триацилглицеридов, начинаются с C12 и C14, а C16 (пальмитиновая кислота) – это главный метаболит биосинтеза жирных кислот у животных. В подавляющем большинстве случаев, жирные кислоты содержат чётное количество атомов углерода. Этому есть чёткое метаболическое объяснение, которое будет актуально в курсе биохимии.

Помимо полностью насыщенных, в природе встречаются **ненасыщенные жирные кислоты**. Причём, их содержание в разных организмах сильно различается. Непредельных связей может быть обычно от одной до трёх. Мы приведём кислоты, которые содержат от 16 до 18 атомов углерода:

- *Олеиновая* (18)
- *Пальмитолеиновая* (16)
- *Линолевая* (18)
- *Альфа-линолеиновая* (18)
- *Гамма-линолеиновая* (18)

Есть два способа нумерации двойных связей:

1) *дельта* (или от карбоксильной группы): $\Delta 9$ говорит о том, что в олеиновой кислоте двойная связь располагается между девятым и десятым атомами углерода.

2) *омега* (с хвоста или *CN-3* группы): $\omega 3$ говорит о наличии двойной связи между третьим и четвёртым атомами углерода с конца.

Сейчас в средствах массовой информации делается упор на *омега-3* и *омега-6*, считается, что они чрезвычайно полезны. Этому нет прямого метаболического объяснения, но только статистические выкладки, которые указывают, что если в *рационе* людей присутствует много *продуктов с повышенным содержанием омега-3* и *омега-6*, то они меньше страдают сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Следует также отметить, что двойные связи, которые присутствуют в составе жирных кислот, пребывают в *цис-изомерной форме*, то есть каждая двойная связь – это *изгиб*. Это влияет на *укладку*: чем больше связей, тем больше зигзагов, и сложнее компактно уложить хвосты.

Для жирных кислот справедливо:

- Чем больше атомов C, тем выше температура плавления;
- Чем больше двойных связей, тем ниже температура плавления.

Триацилглицерид может быть *животного* или *растительного* происхождения. В случае животных это будет *жир*. При комнатной температуре жир – твёрдый. Соответственно, в животном жире много *длинноцепочечных предельных жирных кислот*.

А если мы говорим о растительном масле (которое при комнатной температуре – жидкое), то в этом случае довольно много жирных кислот с двойными связями (и есть короткоцепочечные остатки С4). Основная функция жиров и масел – запас энергии, которая потом будет использоваться организмом по мере надобности.

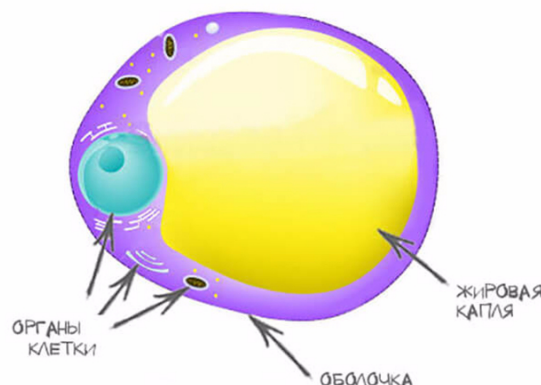


Рис. 21.3. Адипоцит (жировая клетка)

Жировая ткань представлена адипоцитами (Рис. 21.3.). Это вполне полноценная клетка, у которой есть ядро, митохондрии, эндоплазматические ретикулы. Но помимо этого есть также некий мешок, в котором располагаются триацилглицериды. На самом деле, жировая ткань очень сложно организованная, там протекают гормональная регуляция и осуществляются интересные биохимические циклы.

Далее следуют диацилглицериды, которые относятся уже к сложным липидам. Они обладают двумя хвостами. Но помимо этого, есть фосфатная группа и есть голова (полярная). То есть, мы имеем пример амфифильного соединения с полярной головой и неполярными хвостами. В результате этого, образуются интересные структуры. Пока что надо отметить два самых распространённых фосфоглицерида: фосфатидилэтаноламин или кефалин (у него в качестве головы стоит остаток этаноламина, соединённый через фосфатную группу – Рис. 21.4.) и фосфатидилхолин или лецитин (у него голова представлена холином, то есть трижды метилированным этаноламином – Рис. 21.5.).

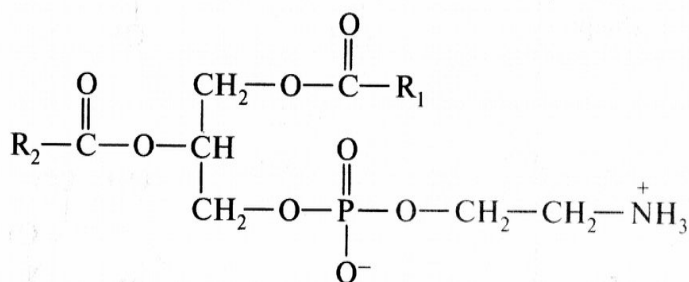


Рис. 21.4. Фосфатидилэтаноламин (кефалин)

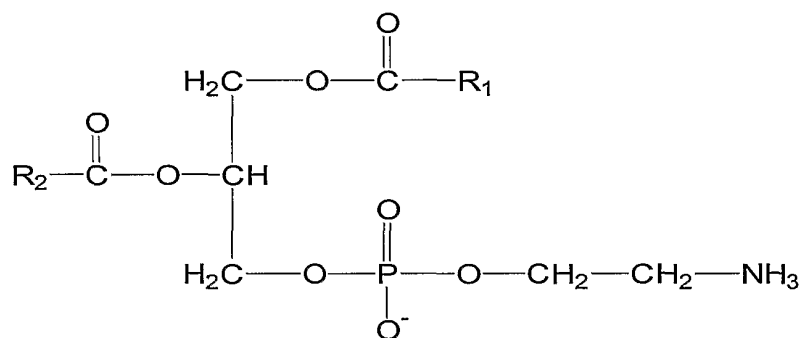


Рис. 21.5. Фосфатидилхолин (лецитин)

Помимо этого, к фосфоглицеридам относится *фосфатидилсерин* (где фосфатная группа цепляется через ОН-группу бокового заместителя). Бывает даже четырёххвостый фосфолипид, который называется *кардиолипин* (встречается не только в сердечной мышце – Рис. 21.6.). Его в организме обязательно должно быть некоторое количество, но не слишком много. Есть ещё *фосфатидилинозит* (полиол, шестиатомный спирт, который похож на углевод, но здесь нет кислорода, так что это – производная циклогексана – Рис. 21.7.). Он тоже крепится определённым образом к фосфатной группе, выполняя *регуляторную функцию* (вторичной передачи гормонального сигнала).

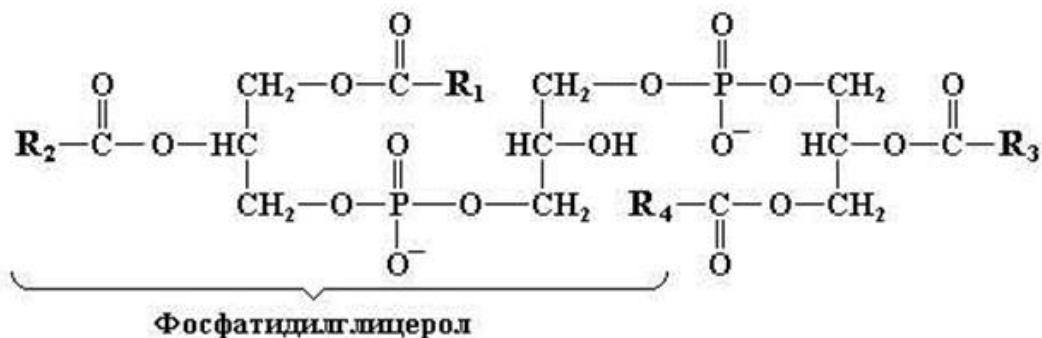


Рис. 21.6. Кардиолипин

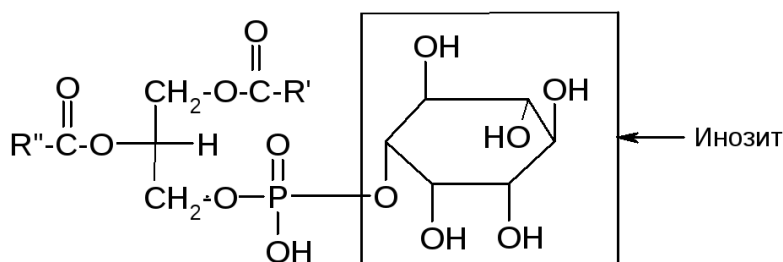


Рис. 21.7. Фосфатидилинозит

Что же может получиться из фосфоглицеридов? Из них могут получаться *разнообразные агрегаты*, главным из которых является *биомембрана*. Мы перейдём к их обсуждению, но прежде нужно сказать о *сфинголипидах*. В принципе, по своей сути они похожи на фосфоглицериды, но есть между ними и отличия. Давайте посмотрим на

серин. Он и сам может быть полярной головой, но если его декарбоксилировать, то получится *этаноламин* (голова кефалина). А если ещё трижды метилировать эту аминогруппу, то получится *фосфатидилхолин*.

В то же время, серин является прародителем и сфинголипидов. Если провести модификацию *с жирным хвостом с одной двойной связью (C15)*, то мы получим *сфингозин* (Рис. 21.8.)– основное соединение в сфинголипидах. Он похож на глицерин с двумя отличиями: *один хвост*, а в центре – *аминогруппа*. Далее он модифицируется остатками той или иной жирной кислоты, и получается *церамид* (Рис. 21.8.). Дальше происходит модификация по оставшимся атомам углерода, и здесь может быть полярная голова, как в глицериде – *сфингомиелин* (основной компонент миелиновых мембран, которых много в мозге – Рис. 21.8.). А может быть ещё модификация различными углеводами: *цереброзиды* (содержит только галактозу, без фосфатной группы), *ганглиозиды* (содержит разветвлённые олигосахариды, мономерными звеньями которых являются остатки глюкозы, галактозы и сиаловой кислоты) и *глобозиды* (содержит несколько углеводных остатков).



Рис. 21.8. Сфингозин, церамид, сфингомиелин

Надо заметить, что именно *состав ганглиозидов определяет группу крови* (А или Б, и их комбинации дают 3-ю и 4-ю группы). Кроме того, это гликолипиды. Мы увидим их функцию, когда будем подробнее говорить о мембранах.

Далее следуют **стероиды**. Основной прародитель – *холестерин* (Рис. 21.9.), который образован четырьмя кольцами с одной двойной связью и алкильным заместителем в одном из колец (неполярная часть), а также ОН-группой (полярная часть). Холестерин – *амфифильное соединение*, в отличие от эфиров холестерина с жирными кислотами, которые являются совсем неполярными. Есть также масса производных холестерина: и *гормоны*, и *витамины*, и прочие соединения.

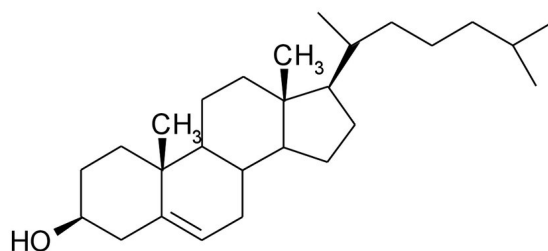


Рис. 21.9. Холестерин

Биомембраны

Сейчас мы должны перейти к **биомембране**, которую рассмотрим в разрезе *жидкостно-мозаичной модели*, которую предложили *Сингер* и *Николсон* (Рис. 21.10.). На самом деле, есть *синтетические аналоги фосфолипидов* (например, додецилсульфат натрия), которые обладают полярной головой и одним хвостом, и образуют *сферические мицеллы*.

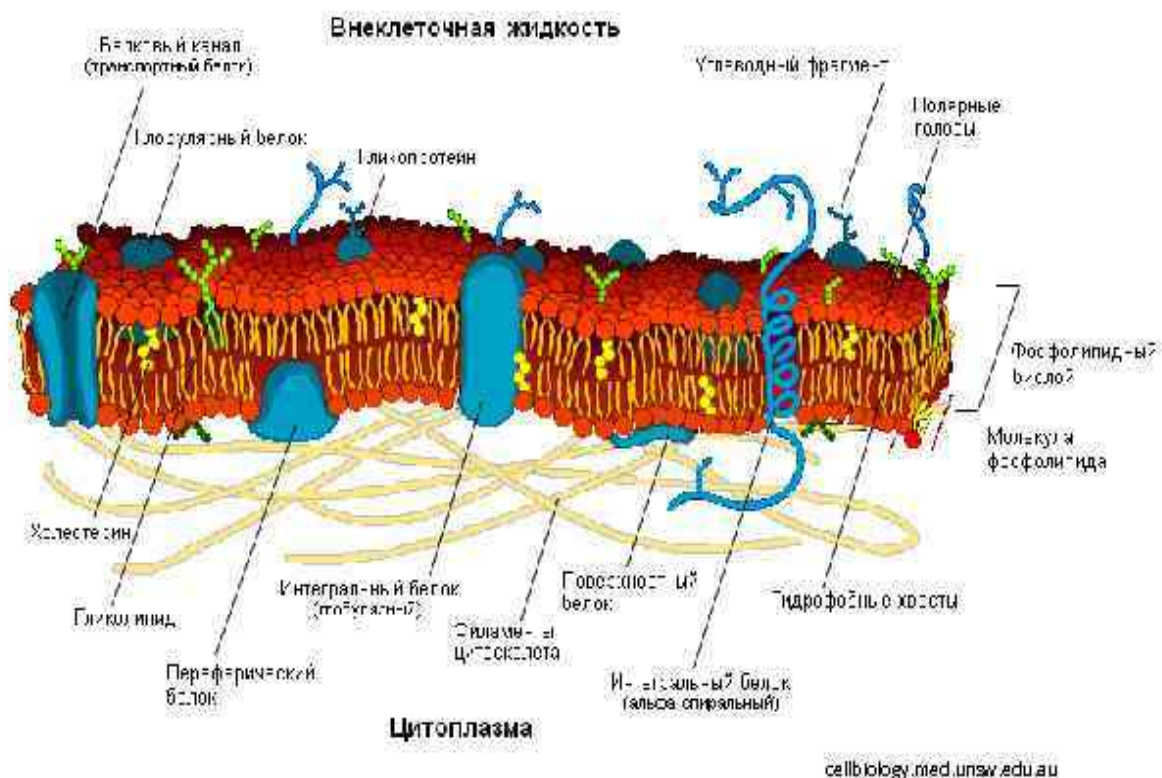


Рис. 21.10. Жидкостно-мозаичная модель мембраны Сингера-Николсона

Движущаяся сила образования таких мицелл – это **желание спрятать неполярные хвосты внутрь и исключить их контакт с водой**. Когда *хвост один* (его сечение относительно головы довольно небольшое), и головы можно довольно плотно уложить в шарик. Но как только мы имеем *два хвоста*, такая сферическая укладка уже

не позволит уберечь их от контакта с водой. Они расталкивают головы, образуя зазоры, в которые может попадать вода. Как же избавиться от этого негативного эффекта? Необходимо распрямиться.

В итоге получается монослой: головы – в одну сторону, хвосты – в другую. Но тогда бы хвосты контактировали с водой. Поэтому мы переходим к бислою: по краям – полярные головы, а внутри – смотрят друг на друга хвосты. Движущая сила образования бислоёв – **желание исключить контакт хвостов с водой**. Если бислоем оставить в таком состоянии, то к нему будут подходить молекулы всё новых фосфолипидов, которые будут достраиваться до *замкнутой структуры*. Это и будет биомембрана (например, плазматическая, которая окружает клетку).

Основная функция мембран – барьерная (то есть, избирательное пропускание тех или иных биомолекул внутрь и наружу, и таким образом, создание внутри среды, которая отличается от внешней). Что вообще может проникать через мембрану? Основной барьер – *неполярная область*, через которую очень *трудно перенести заряд*. Соответственно, маленькие *неполярные молекулы* (типо октана) проходили бы замечательно. Также хорошо проходят туда *полярные незаряженные молекулы*. Хуже, но тем не менее, могут пройти *цвиттер-ионные молекулы* (то есть те молекулы, у которых есть заряженные группы, но суммарный заряд составляет 0). Просто заряженные (хоть положительно, хоть отрицательно) частички не проходят через мембрану (даже такие маленькие, как протоны). Это свойство лежит в основе работы АТФ-синтетазы.

Тем не менее, между внутренней и внешней средой должен быть организован обмен веществ: клетка производит отходы, которые нужно выводить, а внутрь требуется доставлять питательные вещества. Для этого предусмотрены транспортные системы. Они в основном белковые (белковый канал). В биологических мембранах, помимо липидов и фосфолипидов, присутствует большое количество белков. Они бывают трёх типов:

1. **Интегральные белки**, пронизывающие мембрану (держатся за счёт *гидрофобных взаимодействий* между хвостами).
2. **Периферические белки**, затопленные в мембрану, но не пронизывающие её (держатся за счёт гидрофобных взаимодействий).
3. **Поверхностные белки** (которые держатся, взаимодействуя с головами за счёт электростатических взаимодействий).

Одна группа – это интегральные и периферические, другая группа – поверхностные белки. Что ещё есть в мембране? Есть некие антенны, *углеводо-сфинголипиды*, которые нужны для узнавания. Если едет какая-то *транспортная молекула*, необходимо понять, в какую клетку должна быть доставлена «посылка». Зачастую у транспортного белка есть некоторый центр связывания углерода, и дальше происходит *проверка геометрического соответствия* с образованием водородных связей между углеводами и какими-то аминокислотными остатками внутри

транспортного белка. И если всё складывается, значит, «посылка» доставлена правильно, а если нет – значит надо искать другую клетку.

Самое время обсудить, почему же модель жидкостно-мозаичная. *Жидкостная* она потому, что и белки, и мембраны могут *спокойно перемещаться* внутри монослоя. Такая подвижность называется латеральной (она ничем не ограничена, протекая спокойно). *Мозаичная* она потому, что очень часто сфинголипиды и белки *сбиваются в некие комплексы*, именуемые рафтами, и получается мозаичная последовательность островков фосфолипидов и белков. Попутно заметим, что переход липида из одного монослоя в другой – очень редкое событие (потому что для перенесения полярной головы через неполярный слой требуется очень много энергии). Эти процессы называются *флиппы* и *флоппы*, и самопроизвольно они практически никогда не происходят (что позволяет поддерживать разный состав во внешней среде и внутренней среде мембраны). Таким образом, *снаружи* больше *лецитина*, а *внутри* больше *кефалина*. Для перехода из слоя в слой существуют специальные ферменты.

Следует ещё сказать о *холестерине*, которые кольцами внутри, а ОН-группы встроены в полярные головы. Избытки холестерина вредны, так как образуют бляшки и закрывают сосуды, но нельзя сказать, что холестерин вреден. Мы синтезируем всегда какое-то *количество холестерина, необходимое* организму. Холестерин присутствует во всех мембранах, расширяя диапазон, в котором они пребывают в жидком состоянии. При сильном нагревании, мембраны могут развалиться на части. А холестериновые кольца достаточно плоские и готовы залепить на себя много остатков жирных кислотных хвостов. Если же мембрану охлаждать, она перейдёт в гелеобразное состояние. Чем больше холестерина, тем больше нарушается плотная укладка. Тем самым, повышается температурная возможность мембраны пребывать в жидком состоянии.

Посмотрим на транспортную систему мембраны (Рис. 21.11.).

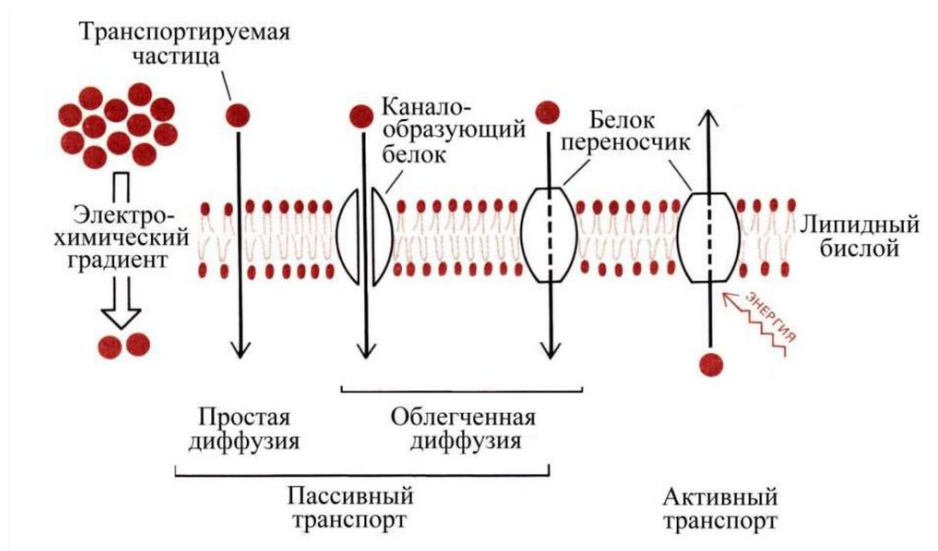


Рис. 21.11. Типы транспорта в биомембрану

Есть мембрана, и есть градиент концентрации некоего вещества (сверху больше, снизу меньше). Бывает *простая диффузия* по градиенту: для некоторых частиц она возможна, для некоторых – нет. У нас есть *облегчённая диффузия* через каналы, либо через транслоказы. А бывает другой тип, когда осуществляется перенос против градиентной концентрации. Для этого требуются запасы энергии, которые берутся из гидролиза АТФ (активный транспорт).

Есть также классификация по направлению и по количеству переносимых молекул:

- 1) Унипорт
- 2) Котранспорт
- 3) Симпорт
- 4) Антипорт

Как я уже говорил, переход внутрь требует гидролиза АТФ:

- **Флиппазы** – «внутри»
- **Флоппазы** – «наружу»
- **Скрамблазы** – в обе стороны по градиенту

Первичный активный транспорт подразумевает гидролиз АТФ, когда во внутрь или наружу что-то проходит. Классический пример – насос. Помимо *первичного* транспорта, есть также *вторичный*: если мы что-то вынесли, то потом по градиенту это можно внести обратно, и за счёт этого *внести ещё что-то полезное* (в данном случае ион). Вторичный активный транспорт подразумевает осуществление первичного транспорта. Активность подразумевает гидролиз АТФ.

Есть **ионные каналы**, которые регулируют множество процессов (в том числе, передачу нервного импульса). Они могут *открываться* и *закрываются* в зависимости от изменения *трансмембранного потенциала* (он может становиться больше, а может уменьшаться). И есть другой вариант: *специализированные молекулы* (например, ацетилхолин), которые связываются с каналом, открывая или закрывая его.

Есть **разобщающие агенты (ионофоры)** – вещества, которые могут связывать ион с одной стороны, переносить его через мембрану, и диссоциировать с той стороны. Пример: если мы возьмём паранитрофенолят и протоны, то в результате связывания может образовываться паранитрофинол, который является суммарно нейтральным и проходит через мембрану, где отдаёт протоны и превращается вновь в исходную форму (но бывают случаи, когда возврат невозможен).

Мы понимаем, что существует огромное разнообразие транспорта. Ещё одним потенциальным элементом мембранного транспорта являются «бочонки» - **порины** (бета-порины), которые построены из бета-листов. Это так называемые *молекулярные «сита»*. Часто говорят, что *двухмембранные* органеллы (такие, как митохондрии) окружены *внутренней мембраной* (абсолютно непроницаемой) и дырявой *внешней*

мембраной. Буквально дырявых мембран, конечно не бывает, потому что за счёт гидрофобных взаимодействий дырки бы заросли при соединении новых молекул фосфолипида. А в данном случае под дырками понимаются порины, которые встраиваются в мембрану и избирательно пропускают соединения по размеру. Это, кстати, один из способов защиты митохондрии. Вообще, есть масса свойств, на основе которых можно пропускать или не пропускать вещества через барьер (мембрану).

Далее рассмотрим **трансмембранный насос** (Рис. 21.12.) на примере *натрий-калиевого*.

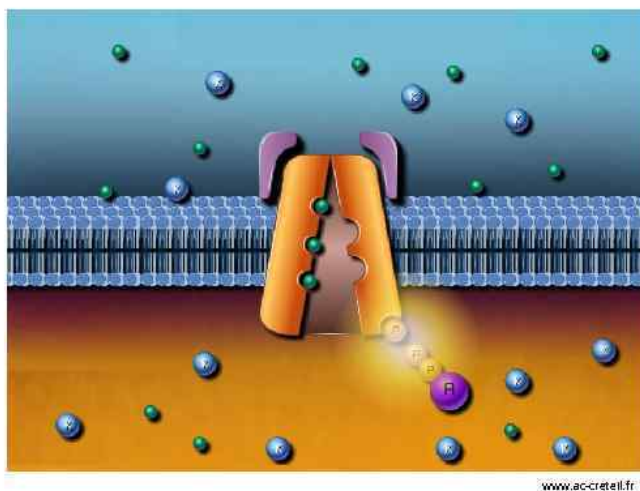


Рис. 21.12. Трансмембранный насос

Так сложилось, что *внутри* клетки аномально много *калия, магния и фосфата*. Соответственно, *наружи* много *натрия, кальция и хлорида*. Этому могут быть различные объяснения (в том числе, эволюционно-биохимические), но это сказывается на том, чтобы работали многие *внутриклеточные ферменты*. Даже если мы организуем некое странное содержание, в конечном счёте, система выровняется. Надо поддерживать градиент концентрации, то есть, фактически нам нужно активным транспортом (против градиента концентрации) выбрасывать наружу натрий, а калий затягивать внутрь.

Мы смотрим на натрий-калиевый насос в тот момент, когда он связал *три молекулы натрия*. Далее произойдёт гидролиз АТФ, молекула развернётся в сторону вне клетки, и три иона натрия *выйдут наружу*. Далее *два больших иона калия* займут их положение, произойдёт конформационное изменение, и они *окажутся внутри*. На одну молекулу АТФ мы выносим 3 молекулы, а заносим 2. Это позволяет нам поддерживать повышенную концентрацию калия (при пониженной концентрации натрия) внутри. Но что-то ещё должно происходить.

Здесь можно организовать *симпорт* и *вторично активный транспорт*. Тогда один ион натрия будет возвращаться, и параллельно будет затягиваться какой-нибудь полезный элемент против градиента концентрации. Например, так работает транспортёр

глюкозы. Соответственно, мы поддержали ионный состав, а также занесли полезное вещество внутрь.

Посмотрим теперь на типы АТФ-аз. Они бывают разные, но нам интересен молекулярный мотор АТФ-аз V-типа и Т-типа (Рис. 21.13.).

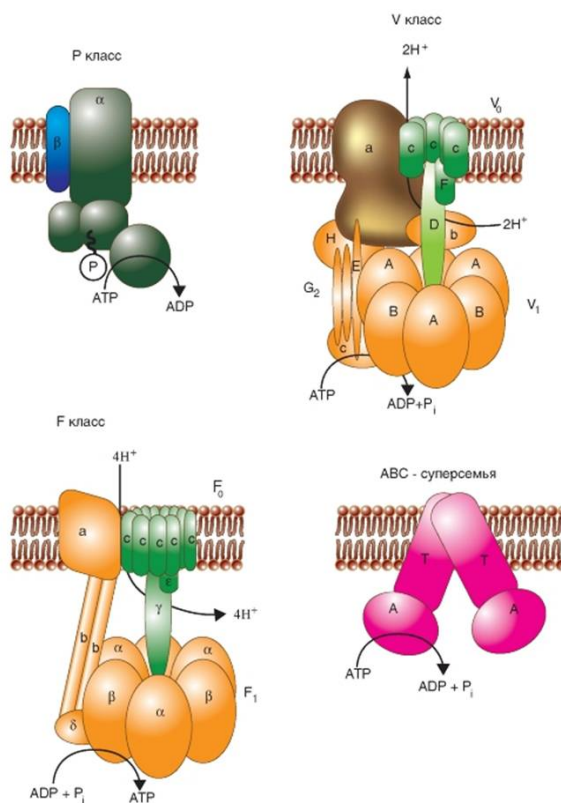


Рис. 21.12. Типы АТФ-аз

В принципе, они довольно похожи. Здесь есть несколько компонентов: есть *компонент, встроенный в мембрану и рабочий элемент*. Соответственно, здесь проходят по градиенту *протоны* (как возникает градиент – отдельная тема в курсе биохимии). Протоны стремятся пройти внутрь, при этом на каждый прошедший протон осуществляется *поворот АТФ-синтазы*, и в результате сложной организации удаётся синтезировать АТФ. Работает V-тип АТФ-азы (молекулярный мотор) за счёт *электрохимического градиента*, который возникает за счёт *окисления топлива*.

Теперь рассмотрим **рафты**, которые содержат самые интересные вещества, и нужны они для разных целей. В частности, они нужны чтобы создавать изгибы: здесь появляется, к примеру, *димер кавеолина* (Рис. 21.13.).

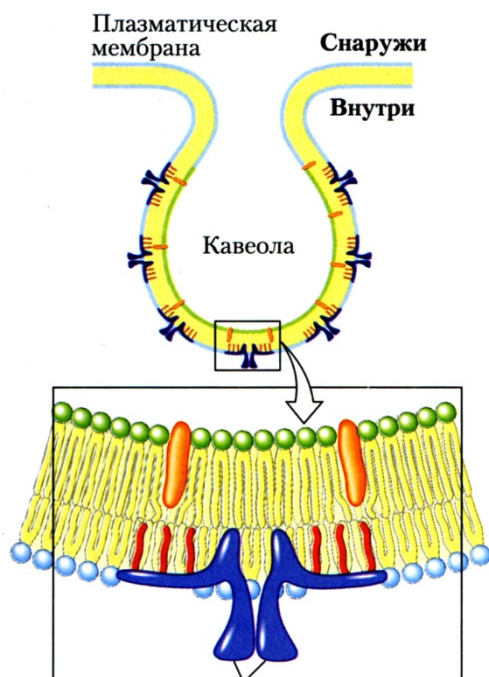


Рис. 21.13. Димер кавеолина

Все изгибы довольно важны, и это способ транспорта и внутрь, и наружу (для этого можно использовать кавеолин, хотя ранее считалось, что эндоцитоз происходит в основном при помощи другого механизма).

Второй способ организации изгибов происходит при помощи *клатрина* и *диаминина* (которые представляют очень интересную систему), которые способны организовывать эндоцитоз. Клатрин представляет собой трискелион. Как идёт процесс? Рецептор поймал некую молекулу, а дальше к ней подходит *клатрин*, образуя трёхмерную структуру, которая похожа на футбольный мяч. Внутри расположены те молекулы, которые требуются для эндоцитоза. Также здесь образуется некая «ножка», которая образована белком *диаминином*.

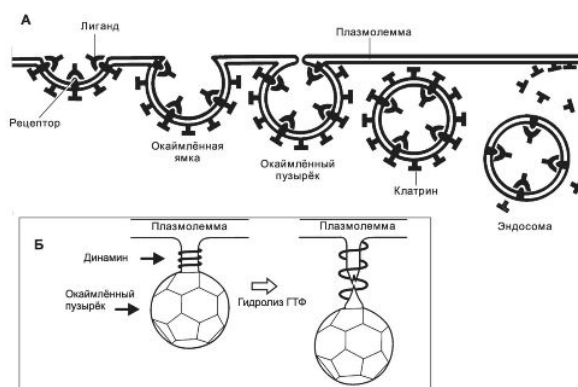


Рис. 21.14. Схема эндоцитоза

Образуется пузырик, окаймлённый клатрином. В результате гидролиза ГТФ, происходит перестройка диамина с отщеплением пузырька. Далее клатрин уходит, а пузырёк с веществами оказывается фактически внутри клетки, и далее снова могут уходить рецепторы, а вещества могут выполнять свою функцию.

Теперь рассмотрим некоторое количество экзотических молекул, которые тоже относятся к липидам. **Эйкозаноиды** – это производные арахидоновой кислоты, у которых четыре двойных связи. Они делятся на **простагландины**, **тромбоксаны** и **лейкотриены** (все являются гормонами, которые действуют на ближайшие клетки). Вообще, гормоны бывают трёх типов:

- 1) **Аутокринные** (вызывают ответ в той клетке, в которое они были произведены)
- 2) **Эндокринные** (выбрасываются в кровь, где переносятся к другим клеткам и могут проходить большие расстояния)
- 3) **Паракринные** (вызывают ответ в соседней клетке).

Эйкозаноиды относятся к *третьему типу гормонов*.

- **Простагландины** – PGE и PGF; сокращение гладкой мускулатуры; кровоснабжение; цикл сна; лихорадка, воспаление и боль.
- **Тромбоксаны** – производят тромбоциты; участвуют в формировании кровяных сгустков.
- **Лейкотриены** – влияют на мышцы дыхательной системы; астматические спазмы, аллергия.

Мы видим, что эйкозаноиды выполняют самые разные функции. Но помимо липидов со сложной эфирной связью, существуют также и **липиды с простой эфирной связью**. Основные представители – *плазмалогены* (у которых эфирная и двойная связь расположены рядом – Рис. 21.15.) и *фактор активации тромбоцитов* (Рис. 21.16.).

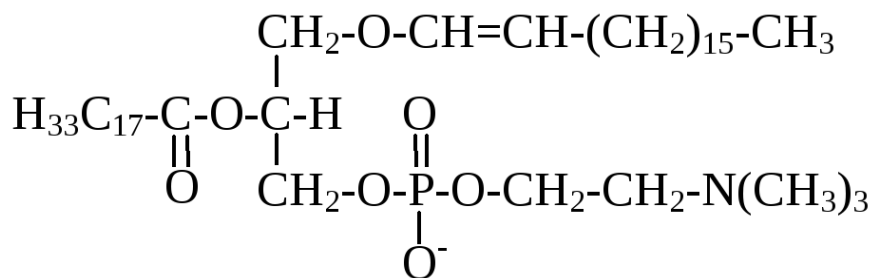


Рис. 21.15. Плазмалоген



Рис. 21.16. Фактор активации тромбоцитов

Плазмалогенов в некоторых мембранах почти до половины. Зачем они нужны – сказать сложно, единственное предположение – *регуляторная функция*. Простая эфирная связь тяжелее гидролизуется, чем сложноэфирная (и с термодинамической точки зрения, и с точки зрения распространённости ферментов). Большинство ферментов в организме гидролизуют сложноэфирную связь. Плазмалогены, по-видимому, придают некоторые особые свойства тем мембранам, в которые они входят.

У растений есть довольно интересные липиды. Они являются производными от глицерина. В их составе имеются жирные кислоты с двумя хвостами, полярные головы представлены углеводами (*моноголактозил* или *дигалактозил*). В случае заряженных полярных голов образуется *сульфо-группа*. У животных в организме присутствует *фосфатная группа*, чтобы создать отрицательный заряд. Но у животных не ограничен доступ к фосфору, а у растений его гораздо меньше (в почве его не очень много). Он нужен в основном для производства ДНК и РНК (нуклеотиды), а в случае липидов можно обойтись альтернативным механизмом: задействуется *сера*.

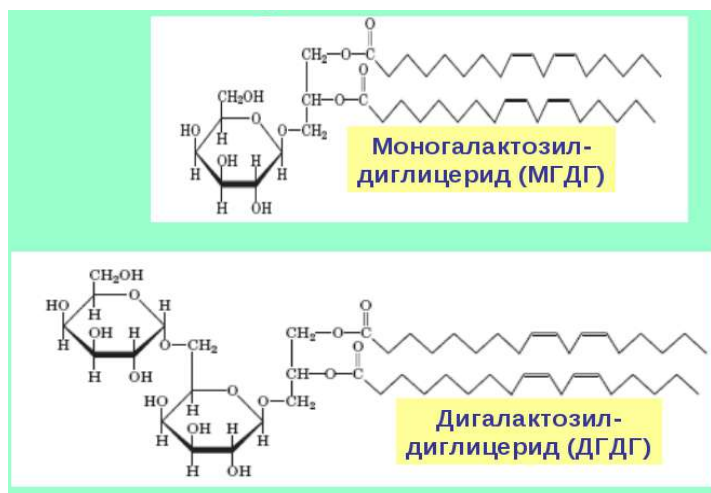


Рис. 21.17. Липиды у растений

Очень интересные изолирующие липиды также у *архей*. **Археи** – это древнейшие организмы (бактерии), живущие в *очень сложной среде* (среды с повышенной

температурой, либо среды с аномальным значением pH). Следовательно, их мембраны должны быть особенно устойчивыми.



Рис. 21.18. Мембранные липиды архей

По длине это – практически бислой, но это одна молекула, то есть нет разрывов и хвостов. Здесь есть некие полярные головы (R-изомеры глицерина), но также производные изопрена (которые представлены молекулами без разрыва).

Далее следуют жирорастворимые витамины (Рис. 21.19).

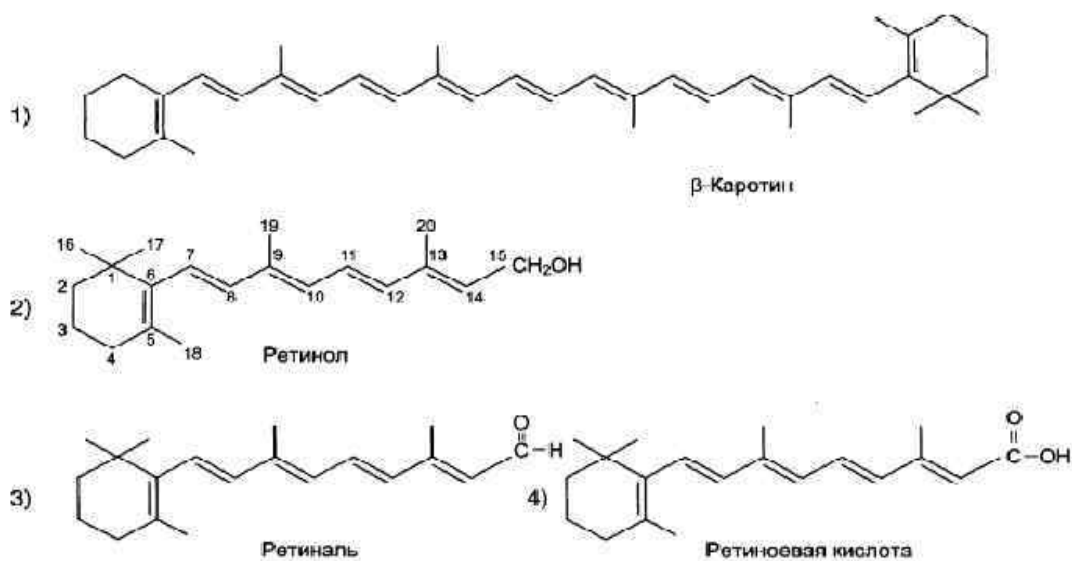


Рис. 21.19. Жирорастворимые витамины

Мы видим провитамин А (он изопреноид, и происходит разрыв связей, гидроксирование), который называется каротин. Он превращается в витамин А, который содержит гидроксильную группу. И далее следует две очень важных производных: ретиналь с альдегидной группой (входит в комплекс с белком опсином, и получается родопсин – важный элемент в передаче зрительного сигнала), а также ретиноевая кислота (важна для создания эпидермального покрова, входит в состав кремов и лосьонов).

Может быть представлен также *холестерин* и *жирорастворимый витамин D* (который важен для метаболизма кальция и фосфата). Мы знаем, что витамин D должен производиться на свету (происходит стадия разрыва связей: на свету одно из колец претерпевает разрыв). Далее происходят модификации в боковом заместителе, и получается D2 (*эргокальциферол*) и D3 (*холекальциферол*).

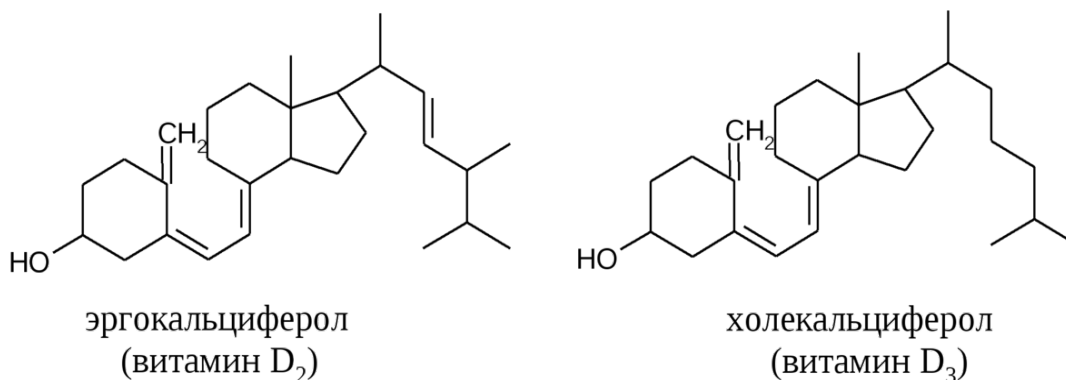


Рис. 21.20. Модификации витамина D

Надо отметить, что даже употребление кальция для укрепления костей лишено смысла без витамина D. Именно он регулирует метаболизм.

Витамины E (Рис. 21.21.) и K (Рис. 21.22.) – жирорастворимые изопреноиды. *Витамин E* – это специфический *антиоксидант*, участвующий во многих процессах, а *витамин K* работает при *свёртывании крови* (здесь работает голова, где происходят хитрые процессы ионно-электронного окисления и восстановления, и происходит переход, в результате которого образуется неканоническая аминокислота – *карбоксиглутаминовая кислота*, которая становится мощным хилатирующим агентом и отлично связывает кальций, который, в свою очередь является важным передатчиком сигнала, ведущего к запуску процесса образования кровяных сгустков).

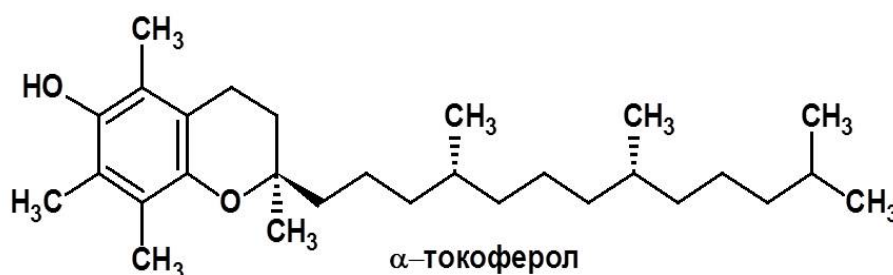


Рис. 21.21. Витамин E

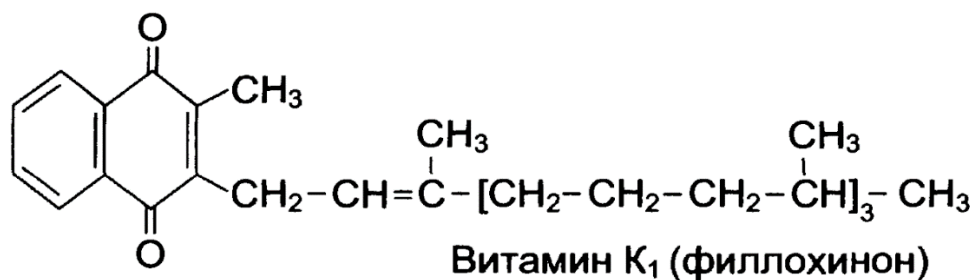


Рис. 21.22. Витамин К

Желчные кислоты безумно важны для усвоения жирной пищи (в кишечнике). При этом в печени вырабатывается *холевая кислота*, а также её производные, которые способствуют образованию прозрачных эмульсий и всасыванию их в кишечник. Излишки желчной кислоты могут быть выведены из организма (вместе с излишками холестерина).

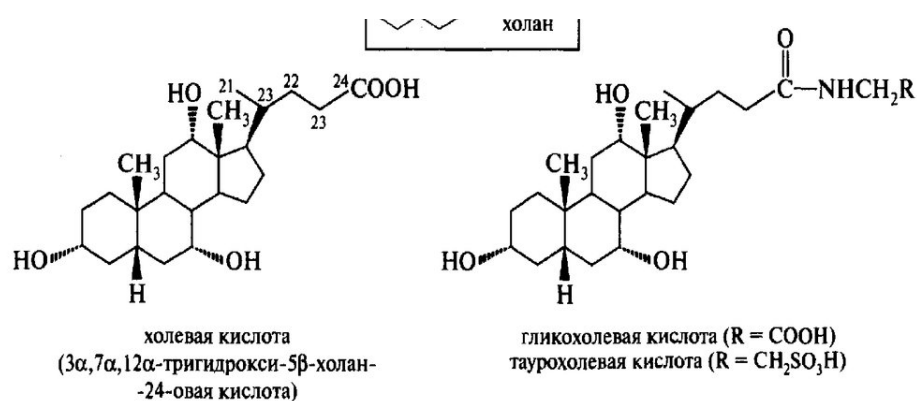


Рис. 21.23. Холевая кислота и её производные

Если поговорить о том, откуда берутся жирные кислоты в клетке, то источниками являются:

- **Триацилглицериды пищи**
- **Внутренние запасы**
- **Жирные кислоты, поступающие из других органов:**
 - *Липопротеины из печени*
 - *комплексы жирных кислот и альбуминов из адипоцитов*

Мы переходим к **липопротеинам**. Процесс всасывания жирных кислот описан несколькими стадиями:

1. *Эмульгирование* при помощи желчных кислот => *мицеллы*.
2. *Гидролиз* под действием липаз => *жирные кислоты* и *моноацилглицериды*.
3. *Всасывание* в эпителиальных клетках кишечника.
4. Там же происходит *синтез хиломикронов*.

5. Перемещение хиломикронов с лимфой и кровью.
6. Потеря жирных кислот и части холестерина.
7. Гидролиз под действием липопротеинлипазы.
8. Превращение в остаток хиломикронов.
9. Захват печенью, переваривание, реутилизация части молекул.

Липопротеины бывают *высокой плотности*, *промежуточные* и *низкой плотности*. В целом их строение подразумевает наличие липидной и белковой частей (Рис. 21.24.).

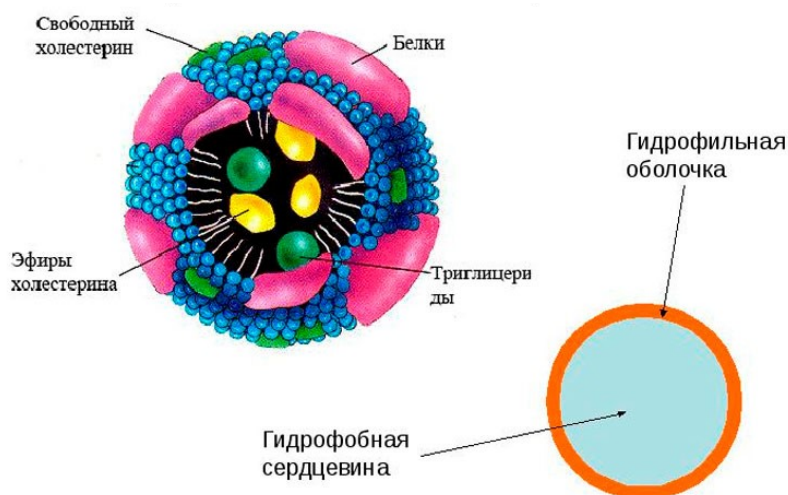


Рис. 21.24. Строение липопротеинов

Внутри преимущественно находятся *триацилглицериды* и *эфиры холестерина* с жирными кислотами (неполярная часть), а снаружи находятся *фосфолипиды* со свободной ОН-группой.

Функции белков-аполипротеинов мы перечислять не будем, но они самые разные: и *активаторы*, и *ингибиторы*, и *транспорт*, и *связь с рецепторами низкой плотности*, и *захват печенью*, и *каталитические*, и *регуляторные функции*, и другие. Стоит заметить, что **чем больше в липопротеине липидов, тем ниже его плотность** (потому что у белка плотность ближе к 1, а у липидов – в районе 0,8).

Триацилглицериды из пищи попадают тонкий кишечник. Образовался большой хиломикрон, который пошёл по организму. Под действием *липопротеинлипазы* идёт отщепление: жирные кислоты переходят в клетку и начинают жить своей жизнью. Образуется некоторое количество холестерина и остатки хиломикрона, которые содержат 10% исходного триацилглицерида. Они захватываются печенью и перевариваются. Печень умеет делать собственные *липопротеины низкой плотности*. Они точно так же, как хиломикроны, разносятся по организму. И далее возможен такой же возврат для переваривания в печени. Но отдельно печень вырабатывает также и *липопротеины высокой плотности* (хороший холестерин, который представляет из себя

диск, собирающий по организму избытки эфиров холестерина и просто холестерина, которые затем отправляются в печень, где могут использоваться при производстве новых липопротеинов, либо могут быть выведены).

Последний момент, который стоит тут отметить – то, как жировая клетка, которая под действием гормонов *активизирует триацилглицериды* (которые раздают различные жирные кислоты). Эти кислоты попадают в кровоток, и здесь *белки-альбумины* (у которых есть продолжительные гидрофобные неполярные участки) прилепляют их, и они с кровью разносятся и раздаются в клетки, и через переносчики жирных кислот они попадают внутрь клеток. Это второй способ доставки (использование запасов, а то, что мы видели ранее – это был транспорт из пищи (то, что делается в печени)).

Дальнейшее рассмотрение липидов разумно будет осуществлять в курсе биохимии, при сопутствующем изучении некоторых важных процессов.

Лекция 22. Энергетика живого.

Фактически нам осталась одна тема, чтобы закончить основные классы азотистых соединений. Начать надо с молекулы АТФ, которая имеет непосредственно ко всей энергетике живого.

Молекула АТФ

Молекула АТФ – это своего рода универсальная энергетическая «валюта». Не надо думать, что это единственная высокоэнергетическая молекула (в организме есть и более богатые энергией молекулы), но это то, в чём энергия хранится и используется для того или иного процесса. Из чего состоит молекула АТФ? Она состоит из азотистого основания (в данном случае – аденина). Почему основания? Потому что при растворении в воде эти соединения дают рН выше 7. Если основание образует N-гликозидную связь с остатком рибозы, то получается нуклеозид (аденин меняется на аденазин). И далее, если присоединяются остатки ортофосфорной кислоты, то получаются нуклеозид-монофосфат, а также ди- и три- фосфаты. Если мы имеем одну фосфатную группу, это будет АМФ (адениновая кислота), если две – АДФ (аденозиндифосфат), если три – АТФ (аденозинтрифосфат).

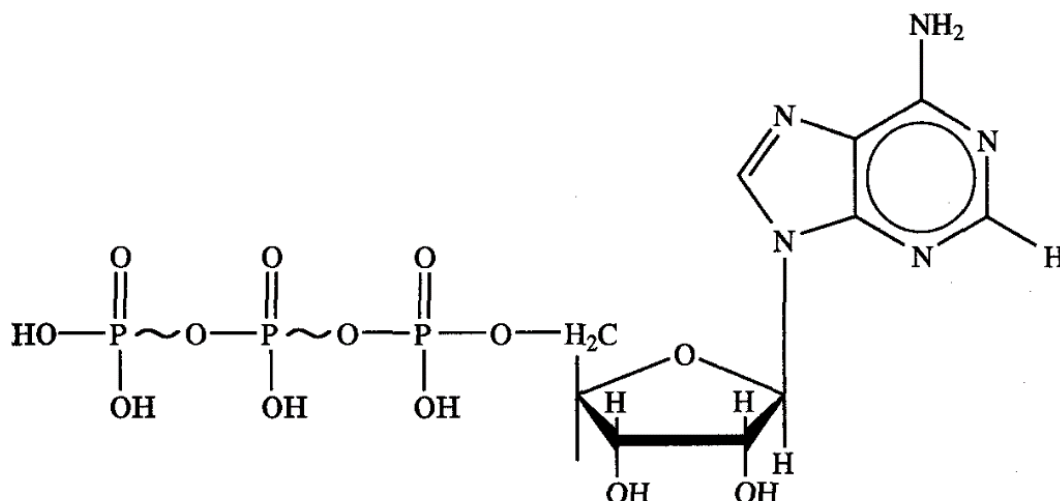


Рис. 21.25. Формула молекулы АТФ

Мы видим, что здесь две связи являются богатыми энергией. При гидролизе в стандартных условиях выделяется порядка 30 кДж / моль. Связь, которая вырабатывается при гидролизе АМФ до аденозина (всего в 1,5 раза менее энергетически богатая), не может рассматриваться как источник энергии. Если это происходит, значит организму очень тяжело. Реальными источниками являются АТФ и АДФ.

Рассмотрим процессы АТФ-цикла (Рис. 21.26.).

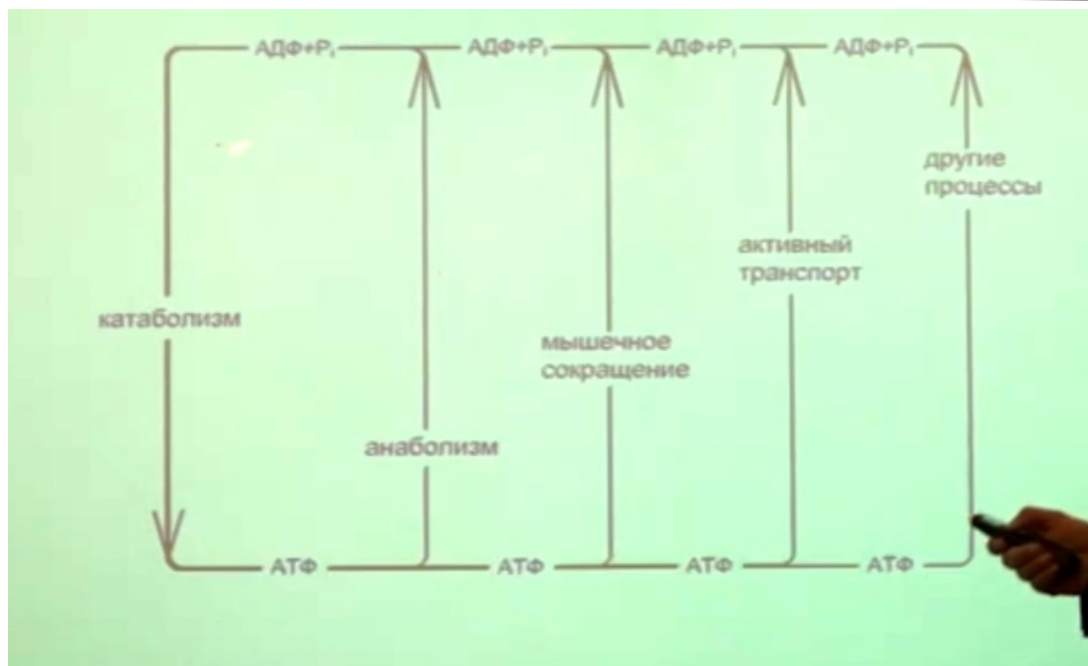


Рис. 21.26. АТФ-цикл

Энергия получается в результате катаболических процессов (окисление пищи). Из АДФ-фосфата получается АТФ (мы видели, как работает *АТФ-синтаза*). Тратится энергия на *биосинтез собственных молекул*, на *мышечные сокращения*, на *активный транспорт*, на *обогрев* и на многие другие процессы.

Нуклеиновые кислоты

Помимо нуклеотидов, нуклеозидов и азотистых оснований, есть ещё и **нуклеиновые кислоты**. Главные из них – *дезоксирибонуклеиновая кислота* (хранилище генетической информации) и *рибонуклеиновая кислота* (передатчик генетической информации). При этом есть несколько видов РНК:

1. **мРНК** – матричная (информационная) РНК: информация о последовательности аминокислот в белках.
2. **тРНК** – транспортная РНК: «доставка» аминокислот.
3. **рРНК** – рибосомная РНК: компонент рибосомы.

Двухцепочечные ДНК знаменуются процессом **репликации** (то есть получением копии цепочки), которая необходима при *делении*. Есть также процесс **транскрипции** (получение по ДНК *транскрипта* аминокислотных последовательностей). В процессе модификации транскрипт нарезается на разные типы РНК (некоторая часть может отбрасываться). Есть также процесс **обратной транскрипции** (далеко не у всех существ генетическая информация хранится в виде ДНК: простейшие хранят её в виде РНК). Есть даже так называемая *гипотеза РНК*, которая подразумевает, что *при зарождении жизни*

для записи информации использовалась именно РНК. И наконец биосинтез белка по РНК, то есть процесс **трансляции**. Все эти процессы вместе образуют **центральную догму молекулярной биологии**.

Давайте поговорим о ДНК и РНК и о том, как они устроены. Есть пять главных азотистых основания. В ДНК входят 4 из них: *аденин, гуанин, цитозин, тимин* (Рис. 21.27.). Два из них являются *бициклическими* и называются *пуриновыми* основаниями (аденин и гуанин), а два другие – *моноциклическими* и называются *пиримидиновыми* основаниями (цитозин и тимин). У них есть некоторое количество аминогрупп и карбонильных групп (азот есть в цикле и вне цикла).

Напомним себе, что: азотистое основание + остаток рибозы = *нуклеозид*; азотистое основание + остаток дезоксирибозы = *дезокси-нуклеозид*; при наличии фосфатной группы – *нуклеотид*. В состав ДНК входит *2'-дезоксирибоза*. Штрихи в остатке сахара связаны с тем, что нумерацию углерода в сахаре нужно *отличать* от его нумерации в азотистых основаниях.

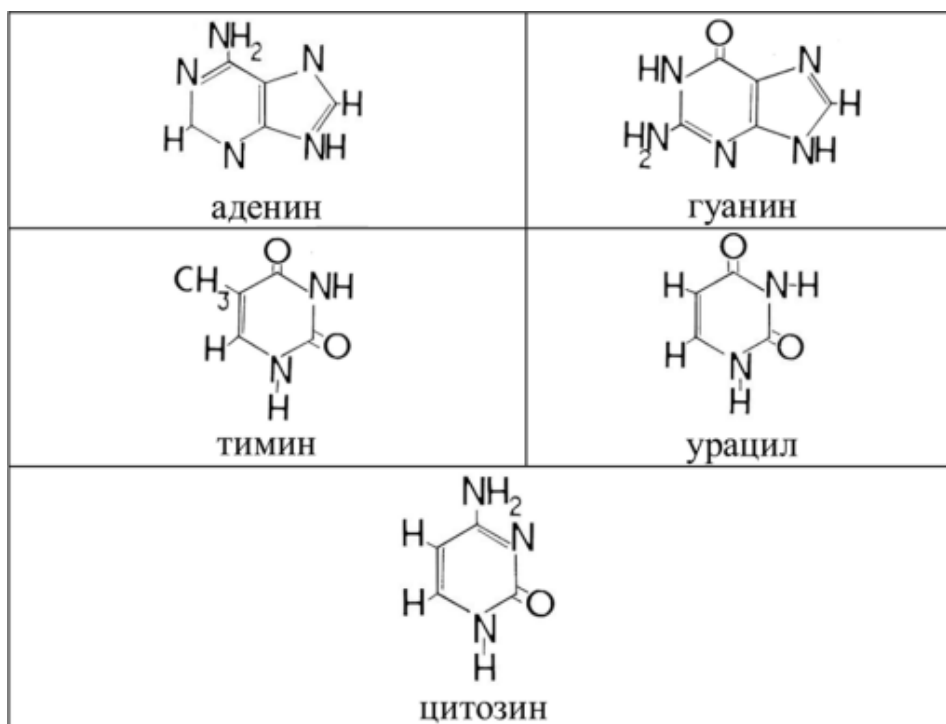


Рис. 21.27. Азотистые основания ДНК и РНК

Индивидуальная цепочка ДНК представляет из себя **последовательность нуклеозидов, соединённых друг с другом через фосфодиэфирную связь**.

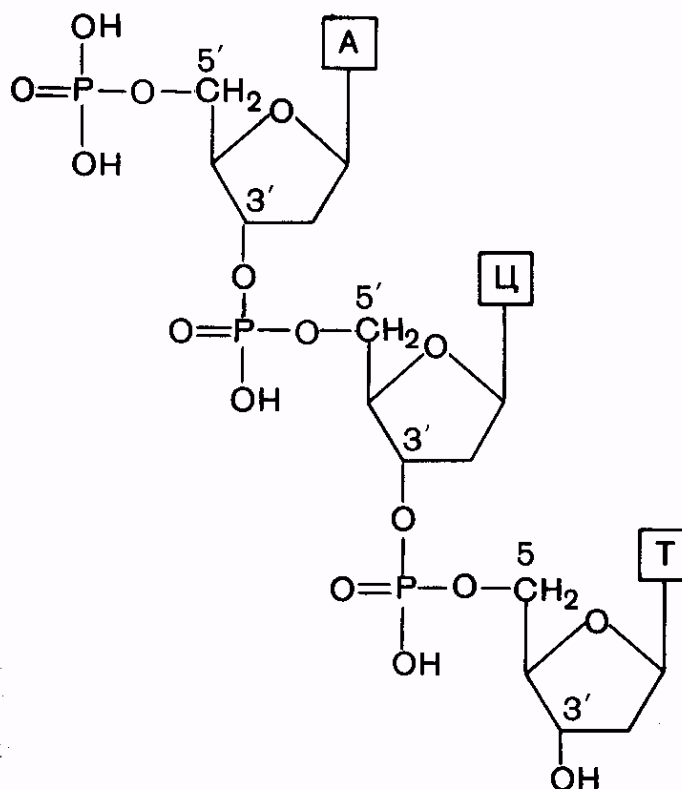


Рис. 21.28. Первичная структура ДНК

Остаток фосфорной кислоты соединён с 3' и 5' группами. При биосинтезе ДНК и РНК входят *трифосфаты*, при этом *двафосфаты* уходят (богатые энергией связи), и остаётся *монофосфат*. В такой модели окажется, что 5'-конец будет заканчиваться тремя *фосфатными группами*, а 3'-конец будет заканчиваться *ОН-группой* (там нет следующего мономерного звена). Соответственно, концы отличаются, и цепи ДНК и РНК имеют *направление* от 5' к 3'-концу (также как белки и полипептиды имеют направление от N-конца к C-концу).

Вторичной структурой ДНК является **двухцепочечная спираль** (или дуплекс), то есть, происходит спаривание, причём по правилу комплементарности: **А всегда с Т, а Г всегда с Ц** (Рис. 21.29). Между А и Т возникают *две водородных связи*, а между Г и Ц – *три водородных связи* (вторая пара прочнее). В составе каждой пары есть одно пуриновое и одно пиримидиновое основания, поэтому *толщина ДНК остаётся неизменной* (составляет три кольца).

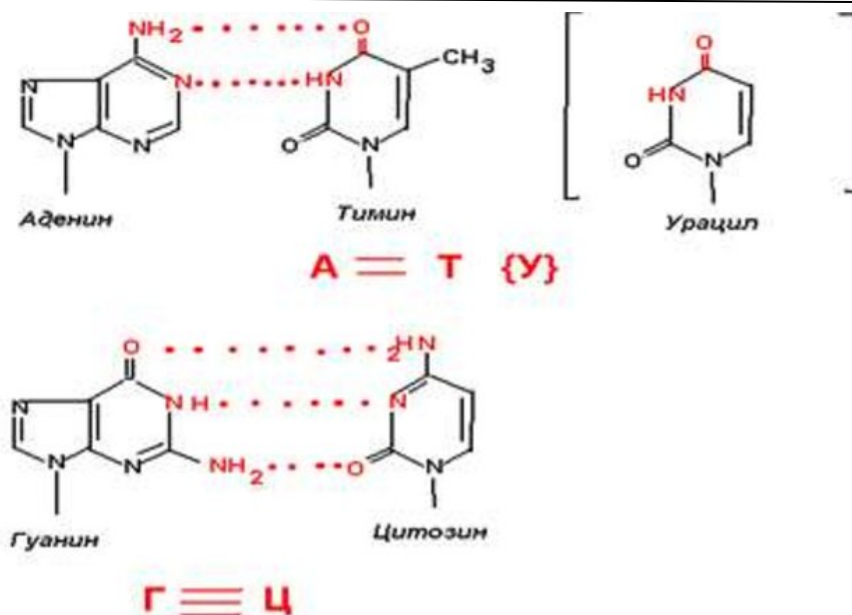


Рис. 21.29. Вторичная структура ДНК

Важно отметить, что *цикл АТГЦ всегда выполняется*, и то, что *цепочки противоположно направлены*: одна от 5' к 3'-концу, другая от 3' к 5'-концу. Соответственно, пользуясь правилом комплементарности, всегда можно достроить вторую цепь по первой. Двойная спираль имеет большую и малую канавки. Держится эта спираль за счёт *водородных связей*, а также, так как кольца азотистых оснований содержат ароматическую структуру (некую делокализацию электронов), то между близко расположенными кольцами могут возникать *частичные перекрытия*.

Здесь стоит сказать о *термоденатурации*. Если взять и прогреть дуплекс ДНК, то до некоторой температуры ничего не произойдёт, и 100% остатков будут в форме двуцепочечной спирали. Но в какой-то момент будет нарушена одна связь, и произойдёт разрыв, и цепи разойдутся. Точка, где половина цепей диссоциирована, а половина – ещё нет, называется **температурой плавления** (или денатурации). Чем больше пар А-Т, тем ниже температура, чем больше пар Г-Ц, тем она выше. Конечно, всё зависит и от длины цепочек, и разница может достигать 30-40 градусов. Если сильно *не перегреть* систему и потом её снова *охладить*, цепи вновь сойдутся по правилу комплементарности. Этот процесс называется **ренатурацией** (такой процесс лежит в основании *метода ПЦР*, актуального сегодня).

На этом дело не заканчивается. Молекулы ДНК бывают довольно длинными и тонкими, поэтому требуется компактизация. Она осуществляется по-разному. В случае бактерий, у которых основная молекула ДНК – *кольцевая* (нет начала и конца), цепь *суперспирализуется*. Так же у бактерий есть небольшие циклические молекулы ДНК – плазмиды (которые используются в биотехнологических целях для производства и рекомбинации белка). А в случае животных сначала идёт *упаковка белков*, когда молекулы ДНК накручиваются за счёт *электростатических взаимодействий* (потому

что ДНК – это полианион, то есть, там много отрицательно заряженных групп). Далее образуются *фибриллы*, а потом *петли*. В конечном счёте, удаётся добиться компактизации в 700 раз, соответственно, можно уложить в животной эукариотической клетке всю молекулу ДНК.

Давайте также скажем в двух словах о репликативной вилке (Рис. 21.30.). Чтобы начался процесс репликации генетического материала, надо, чтобы сначала пришёл фермент *топоизомераза* и раскрутил спираль. Затем должен прийти фермент *хеликаза* и разрушить водородные связи (закрепить одноцепочечное состояние с помощью *SSB-белков*). И дальше вступают в дело *ДНК-полимеразы*. У них есть такое свойство: они создают цепочку только в одном направлении (от от 5' к 3'-концу растущей цепи).

Соответственно, в нижнем случае всё идёт хорошо (эта цепь называется ведущей). Во второй цепи направление противоположное, и её надо синтезировать справа-налево. Это делает фермент *ДНК-полимераза I*, которая создаёт кусочки (*фрагменты Оказаки*), а дальше подходит *ДНК-лигаза*, которая подшивает эти отдельные кусочки в единую цепь.

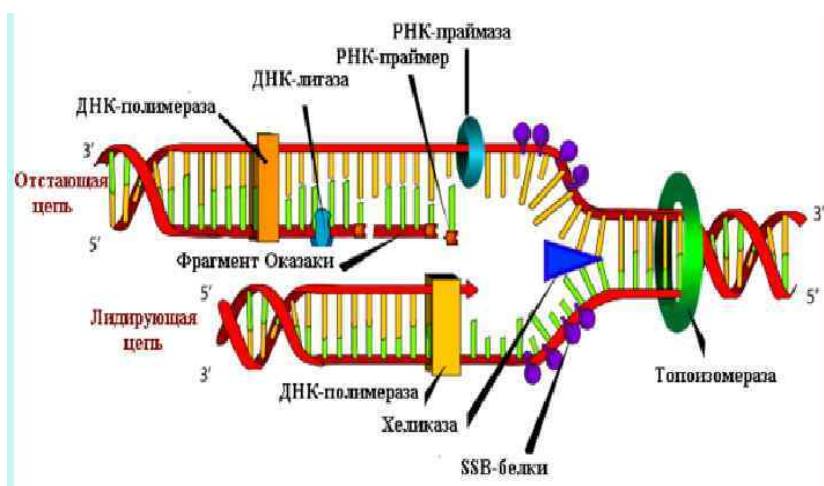


Рис. 21.30. Репликативная вилка

Эта вторая цепь называется *отстающей*. Что касается РНК, то азотистые основания – те же самые, но вместо тимина появляется *урацил*. Урацил отличается от тимина тем, что в нём *нет метильной группы* (Рис. 21.29.). Дальше всё происходит точно также, кроме того, что в 2'-положении ОН-группа. Индивидуальная цепочка РНК образуется точно также: **рибонуклеозиды, соединённые фосфодиэфирной связью через фосфатные группы**. У ДНК здесь был водород, а у РНК – ОН-группа. Поэтому потенциально можно допустить атаку ОН-группы на электрофильный атом фосфора, что приводит к разрыву связи с образованием циклического эфира. Это приведёт к разрыву цепочки (что *недопустимо* в случае ДНК). Соответственно, организм идёт на серьёзные *энергетические затраты*, лишь бы исключить возможность такого обрыва. В случае РНК этот обрыв не является критичным (это гораздо *более лабильная* молекула, потому что она является производной от ДНК).

У РНК также есть и свои вторичные структуры (в зависимости от вида РНК). У *транспортной РНК* такой структурой является «*клеверный лист*» (здесь есть *стебли*, где присутствуют водородные связи, и *петли*, где этих связей нет). Тут присутствует существенное количество *неканонических азотистых оснований* (не только А, У, Г и Ц). Очень важно, что здесь есть **антикодоновый триплет**, который вступает во взаимодействие на рибосоме с информационной РНК: идёт проверка, правильная ли РНК пришла с аминокислотой. Если всё правильно, то привезённая аминокислота встраивается в растущий белок, а если нет, то происходит замена.

В процессе **транскрипции** видно, что РНК создаётся по ДНК матрице (процесс похож в некоторой степени на процесс *репликации*). Но это, конечно же, упрощённая схема.

И закончить эту часть следует указанием на существования **универсального генетического кода**. Триплет (последовательность трёх азотистых оснований) в составе молекулы ДНК или РНК кодирует ту или иную аминокислоту. И мы видим, что в большинстве случаев более чем одна комбинация кодирует одну и ту же кислоту. Также есть старт и стоп-кодона. Но третья буква триплета уже не так важна. То есть, нам важно, к примеру, чтобы первая буква была У, а вторая – С, и тогда, вне зависимости от того, какая будет третья буква, получится *серин*. Иногда в качестве третьей буквы выступает незаконченное азотистое основание (этого достаточно для правильного протекания трансляции). Важно всегда иметь в виду этот код (из ДНК – в белок, или из РНК – в белок).

Тем самым мы заканчиваем структурную часть «Введения в специальность».



ХИМИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА

teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ